

Aus der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

und dem
Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Extrakorporale Stoßwellentherapie bei atropher Tibiapseudarthrose –
Untersuchungen des Knochenstoffwechsels**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

**an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von
Alexander Preuß
aus Gräfelfing
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Markus Maier
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Ekkehard Euler Priv. Doz. Dr. med. Oliver Reich
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Jörg Hausdorf
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	18.06.2009

gewidmet
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	4
2.1. Biophysikalische Eigenschaften extrakorporaler Stoßwellen	4
2.1.1. Physikalische Eigenschaften extrakorporaler Stoßwellen	4
2.1.2. Generierung extrakorporaler Stoßwellen	6
2.1.3. Akustische Felder und deren Ausbreitung	9
2.1.4. Methoden zur Druckmessung	14
2.1.5. Biologische Wirkung im Gewebe	15
2.2. Die Pseudarthrose	19
2.2.1. Definition und Erscheinungsformen	19
2.2.2. Die atrophe Pseudarthrose	21
2.2.3. Klinische Relevanz	22
2.2.4. Aktuelle Behandlungsstrategien	22
3. Material und Methodik	24
3.1. Modellaufbau	24
3.1.1. Versuchstiere	26
3.1.2. Operation zur Induktion einer Pseudarthrose	26
3.1.3. Applikation elektrohydraulisch generierter Stoßwellen	29
3.2. Methodik der Untersuchungen	32
3.2.1. Röntgenuntersuchung	33
3.2.2. Szintigraphische Messung: Mischphase und Statische Phase	33
3.2.3. Computergestützte Analyse der Szintigraphie	36
3.2.4. Untersuchung der Knochenwachstumsmarker im Serum	38
3.2.5. Statistische Analyse	41

4. Ergebnisse	<u>42</u>
4.1. Röntgenologische Beurteilung	<u>42</u>
4.2. Szintigraphie	<u>45</u>
4.2.1. Arterielle-Flow Messung	<u>45</u>
4.2.2. Mischphase Messung	<u>45</u>
4.2.3. Statische Phase	<u>47</u>
4.3. Serologische Untersuchung	<u>51</u>
4.3.1. Osteocalcin	<u>51</u>
4.3.2. bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)	<u>52</u>
4.3.3. TGFβ1 (Transforming Growth Factor β1)	<u>53</u>
4.3.4. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	<u>54</u>
4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	<u>55</u>
 5. Diskussion	 <u>56</u>
5.1. Validität der Methoden – Behandlung	<u>56</u>
5.1.1. Wahl der Stoßwellenparameter	<u>56</u>
5.1.2. Stoßwellenaufbau	<u>57</u>
5.2. Validität der Methoden – Untersuchung	<u>57</u>
5.2.1. Röntgenologische Beurteilung	<u>57</u>
5.2.2. Szintigraphie zur Messung des Knochenstoffwechsels	<u>58</u>
5.2.3. Szintigraphie mit ^{99m} Tc-DPD versus ^{99m} Tc-MDP	<u>58</u>
5.2.4. Knochenwachstumsmarker Messungen	<u>59</u>
5.3. Ergebnisdiskussion	<u>59</u>
5.3.1. Wirkung auf den Knochenstoffwechsel – Szintigraphie Befund	<u>62</u>
5.3.2. Systemische Messung lokaler Stoffwechselvorgänge im Serum	<u>63</u>
5.3.3. Wertung der Ergebnisse	<u>67</u>
 6. Zusammenfassung	 <u>69</u>

7. Literaturverzeichnis	<u>71</u>
Anhang	<u>86</u>
I Übersicht tierexperimenteller und klinischer Studien	<u>86</u>
II Gesamttabelle Übersicht	<u>89</u>
III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	<u>93</u>
Danksagung	<u>95</u>
Lebenslauf	<u>97</u>

1. Einleitung

Entwicklung und Geschichte:

Die Erforschung von extrakorporalen Stoßwellen (**ESW**) für medizinische Zwecke geht der bahnbrechenden erstmaligen Behandlung eines Patienten mit Nierensteinleiden im Jahr 1980 (Chaussy et al., 1980) an der Universität München einige Jahre voraus. Anfang der siebziger Jahre wurde zum ersten Mal experimentell nachgewiesen, dass Stoßwellen Nierensteine zertrümmern können (Häusler and Kiefer, 1971). In den folgenden Jahren wurde die Eignung einer durch Funkenentladung erzeugten, mittels eines Ellipsoid fokussierten extrakorporalen Stoßwelle zur Steinzertrümmerung untersucht (Eisenberger and Chaussy, 1978;Forssmann et al., 1977). Behandlungsversuche an steintragenden Hunden und in-vitro Versuche bezeugten eine ausreichende Fragmentationswirkung des Lithotriptors bei geringer Nebenwirkung auf das umliegende Gewebe (Chaussy, 1982). Ab dem Jahr 1985 folgte die Behandlung von Gallen- (Sauerbruch et al., 1986), Pankreas- (Sauerbruch et al., 1987) und Speichelsteinen (Iro et al., 1989). Hier konnte sich die Stoßwellentherapie aber nicht dauerhaft durchsetzen. Die extrakorporale Stoßwellen Therapie (**ESWT**) wird heute als medizinisches Standardverfahren zur Zertrümmerung von Nierensteinen und Steinen der ableitenden Harnwege (Lithotripsie) eingesetzt, mit dem Ziel der mechanischen Desintegration und Fragmentierung der Konkremente (Delius, 2000;Delius, 2002;Rassweiler et al., 2001;Thiel, 2001).

Neben dem bisher aufgeführten Behandlungsgebiet sind es aktuell in der **Orthopädie** (Maier et al., 2002b) folgende vier Krankheitsbilder, bei denen die ESWT als etablierte Methode, teilweise auch als nicht fokussierte, also radiale Stoßwelle, zum Einsatz kommt:

1. Tendinosis calcarea der Rotatorenmanschette (Daecke et al., 2002;Gerdesmeyer et al., 2003;Maier et al., 2000a;Rompe et al., 2001b;Wang et al., 2001b)
2. Epicondylitis humeri radialis (Hammer et al., 2000;Ko et al., 2001;Maier et al., 2001b;Melikyan et al., 2003)
3. plantare Fasciitis (Chen et al., 2001;Kudo et al., 2006;Maier et al., 2000b;Ogden et al., 2001a;Sems et al., 2006)
4. aseptische Pseudarthrose (Beutler et al., 1999;Rompe et al., 2001a;Schaden et al.,

2001;Schleberger and Senge, 1992;Vogel et al., 1997;Wang et al., 2001a)

Überlegung:

Die aseptische Pseudarthrose stellt nach wie vor jeden betroffenen Patienten und seinen Arzt vor die schwierige Entscheidung der geeigneten Behandlung. Bei der hypertrophen Pseudarthrose versucht man zuerst eine konservative Therapie mit konsequenter Ruhigstellung, bei Ausbleiben der Heilung einen Verfahrenswechsel. Die **atrophe Pseudarthrose** wird in der Regel operativ behandelt. Die fokussierte Stoßwellenbehandlung im Vergleich zu dem operativen Eingriff mit Anfrischung, Interponat von autologem Knochenmaterial und Osteosynthese geht mit deutlich weniger Komplikationen einher. Sie ist in Bezug auf die atrophe Pseudarthrose eine vielversprechende, risikoarme Behandlungsmethode, die noch nicht abschließend untersucht ist und weiterer **experimenteller** und klinischer Forschung bedarf (Biedermann et al., 2003;Birnbaum et al., 2002).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Untersuchung folgender Hypothesen:

- a) Die ESWT am Kaninchenmodell mit standardisierter atropher Tibiapseudarthrose induziert eine höhere Heilungsrate als der Spontanverlauf.
- b) Die ESWT führt im Serum zu einem messbaren Anstieg der Knochenwachstumsfaktoren: Mineralisierungsmarker Osteocalcin, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Transforming Growth Factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) und dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).
- c) Durch die ESWT kommt es zu einem gesteigerten Knochenmetabolismus. Dies lässt sich skelettszintigraphisch mittels ^{99m}Tc -DPD untersuchen.

Thematische Einführung:

Extrakorporale Stoßwellen sind alleinstehende Druck-Pulse von einigen Mikrosekunden Länge und maximalem Amplitudendruck von etwa 5 bis 120 Megapascal (MPa). Sie werden außerhalb des Körpers generiert und entstehen dort als akustischer Puls, der fokussiert wird. Die Fortleitung der Wellen in einem Ankoppelungsmedium unter Vermeidung von Impedanzsprüngen bedient sich im Hautbereich eines großflächigen Areals. In tieferen Gewebeschichten kommt es zur **Konvergenz** der fokussierten Stoßwellen. An der Nierenstein-

(Knochen-) Weichteilgrenze kommt es aufgrund des Impedanzsprungs zur teilweisen Energiefreisetzung. Direkte Kraftwirkung führt zur Lithotripsie. Beugungsbedingt entsteht zusätzlich eine Zugwelle, mit möglicher indirekter Krafteinwirkung durch Kavitation (Unterdruckblasen) (Delius, 1995;Philipp and Lauterborn, 1998;Thiel, 2001;Wolfrum et al., 2003). Abzugrenzen hiervon ist die radiale Stoßwelle, bei der es zur **Divergenz** im Gewebe kommt. Vor allem oberflächennahe Erkrankungen können so behandelt werden.

Der Einfluss der extrakorporalen Stoßwelle speziell auf den Knochen ist vielfältig und von der Energieflussdichte, sowie der Art der Stoßwellengenerierung abhängig. Inzwischen gibt es eine Reihe von Untersuchungen der Wirkung auf den Knochen. Ab etwa 1995 folgten histopathologische Analysen, die eine trabekuläre und kortikale Knochenneubildung im Bereich der Fokuszone am Tiermodell zeigen konnten (Delius et al., 1995;Graff, 1989;Ikeda et al., 1999). Eine Mikrofrakturierung wurde dabei als Wirkmechanismus zur Knochenneubildung diskutiert. Später folgten weitere in-vivo Studien, um nähere Erkenntnisse über die Wirkung extrakorporaler Stoßwellen auf gesundes Knochengewebe zu erlangen, wie es beispielsweise in dem gesunden Randgebiet der Pseudarthrose vorkommt. Gezeigt werden konnte hierbei auch eine Knochenneubildung mit niedriger Energieflussdichte ohne Mikrofrakturierung (Maier et al., 2002a) und ein damit verbundener Schutz des Patienten vor erheblichen Nebenwirkungen.

In Bezug auf die atrophe Pseudarthrose entsteht damit die Aussicht, die **ESWT** bei verhältnismäßig geringen Nebenwirkungen in der klinischen Anwendung weiter zu untersuchen. Eine kleine Anzahl klinischer Anwendungsbeobachtungen ist bereits veröffentlicht, die widersprüchliche, teilweise sehr gute aber auch schlechte Ergebnisse bei einer inhomogenen Art der Stoßwellenerzeugung, Fokusenergie und Frakturlokalisation liefern (Birnbbaum et al., 2002;Fritze, 1998;Rompe et al., 1997;Schleberger and Senge, 1992;Valchanou and Michailov, 1991). Zwei homogene, experimentelle Studien zur hypertrophen Pseudarthrose existieren bereits (dos Santos Neto and Volpon, 1984;Johannes et al., 1994), eine Untersuchung zur Stoßwellenbehandlung atropher Pseudarthrosen wurde bisher nicht durchgeführt.

Die Versuche zur Überprüfung der oben formulierten Hypothesen erfolgten mittels radiologischer, nuklearmedizinischer (^{99m}Technetium-DPD mit Gammakamera) und immunologischer Untersuchungen (Enzymimmunoassay-Techniken).

2. Grundlagen

2.1. Biophysikalische Eigenschaften extrakorporaler Stoßwellen

2.1.1. Physikalische Eigenschaften extrakorporaler Stoßwellen

Stoßwellen sind **einzelne stehende, akustische Druckpulse** und benötigen ein Medium zur Ausbreitung. Bei medizinisch genutzten Stoßwellen handelt es sich bei dem Medium in aller Regel um Flüssigkeiten, in denen die Stoßwellen außerhalb des Körpers erzeugt und von dort in biologisches Gewebe eingekoppelt werden (Brendel, 1986; Wess, 2004). Charakterisiert sind sie durch ihren spezifischen Verlauf, der im Wesentlichen zwei Phasen umfasst:

Die erste Phase beinhaltet eine positive Druckamplitude (**A in Abbildung 1**) mit steilem Anstieg und exponentiellem Abfall der Kurve hin zum atmosphärischen Umgebungsdruck. In der sich anschließenden zweiten Phase folgt eine negative Druckamplitude (**B in Abbildung 1**), die am Ende ebenfalls wieder den atmosphärischen Umgebungsdruck erreicht (Folberth et al., 1992). Eine typische Stoßwelle dauert weniger als 10 Mikrosekunden.

Wie in **Abbildung 1** veranschaulicht, sind Stoßwellen prinzipiell durch folgende Eigenschaften charakterisiert (Maier et al., 1998; Wess et al., 1997):

- **Positiver Spitzendruck (P_+):** P_+ ist definiert als die Differenz zwischen dem maximal positiven Spitzendruck der Stoßwelle und dem Umgebungsdruck. P_+ erreicht Werte zwischen 5 MPa und 120 MPa.
- **Negativer Spitzendruck (P_-):** P_- ist definiert als der maximal negative Spitzendruck während der zweiten Phase der Stoßwelle. P_- erreicht Werte zwischen 10% bis 20% von P_+ .

- **Anstiegszeit (T_r):** T_r ist definiert als das Intervall, in dem der Druck von 10% von P_+ bis auf 90% von P_+ ansteigt. T_r kann Werte von unter 1 ns bis 500 ns annehmen.
- **Pulsbreite (T_w):** T_w ist definiert als das Zeitintervall, bei dem der Druck 50% oder mehr von P_+ beträgt. Die Dauer von T_w beträgt zwischen 200 ns und 500 ns. Für T_w wird synonym auch der Begriff “full-width-half-maximum” (FWHM) verwendet. Die Dauer von T_w beeinflusst direkt die Energieflussdichte extrakorporaler Stoßwellen.

Die Werte von P_+ , P_- , T_r und T_w einer Stoßwelle hängen von der verwendeten Stoßwellenquelle ab.

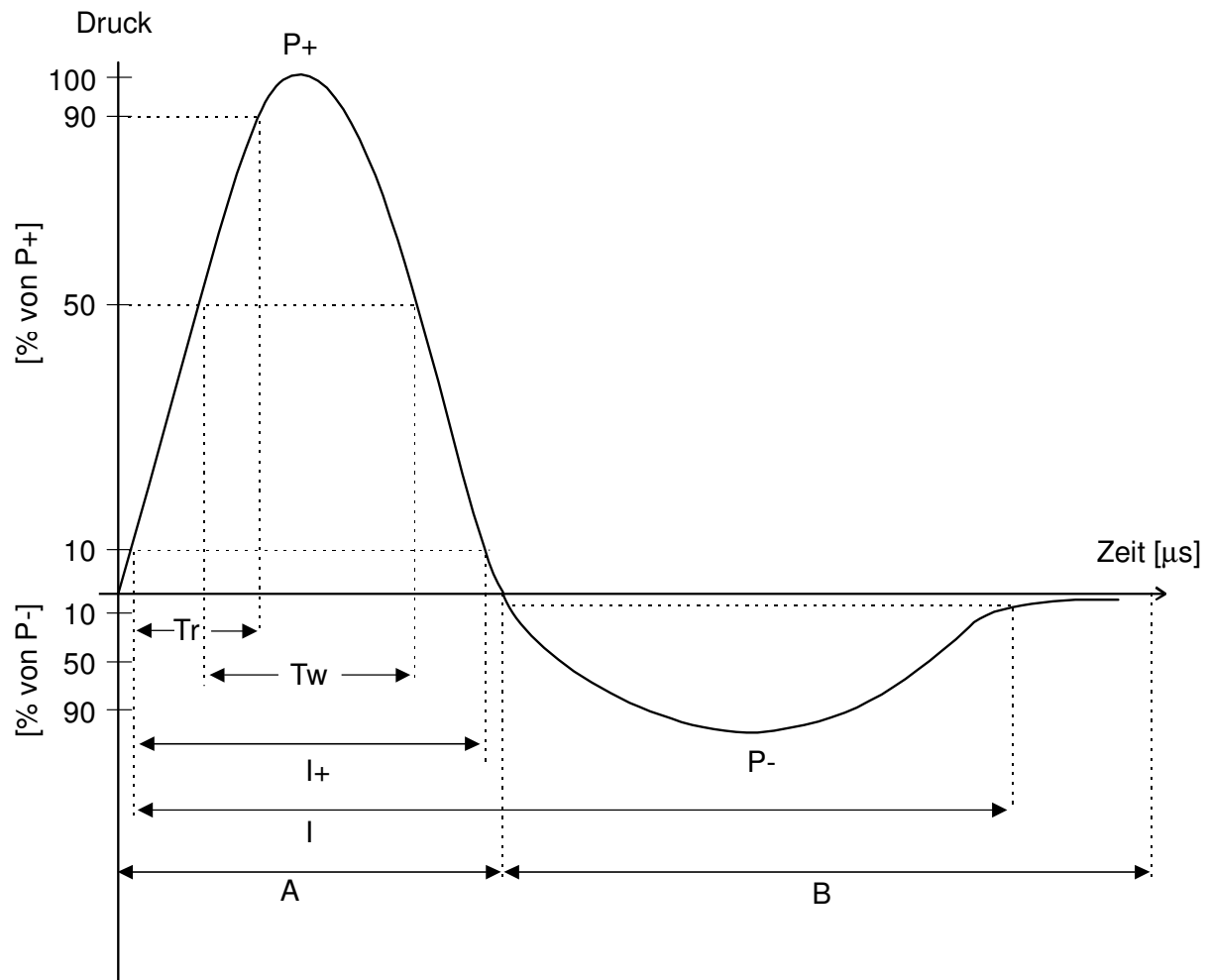


Abbildung 1: Graphische Darstellung einer standardisierten Stoßwelle.

Der Stoßwellendruck ist als Funktion der Zeit aufgetragen. A, erster Anteil der Stoßwelle mit positivem Druck; B, zweiter Anteil der Stoßwelle mit negativem Druck. P_+ , positiver Spitzendruck; P_- negativer Spitzendruck. T_r , Anstiegszeit, T_w , Pulsbreite. I_+ , Standardzeitintervall zur Berechnung der sogenannten "positiven Energien" der Stoßwellen; I , Standardzeitintervall zur Berechnung der sogenannten "totalen Energien" der Stoßwellen. A, B, P_+ , P_- , T_r und T_w werden detailliert im Text beschrieben.

2.1.2. Generierung extrakorporaler Stoßwellen

Bei der Applikation extrakorporaler Stoßwellen im klinischen Einsatz müssen die akustischen Druckpulse gebündelt und auf die jeweilige Zielregion fokussiert werden. Bei der Erzeugung und Bündelung extrakorporaler Stoßwellen kommen heute im Wesentlichen drei

unterschiedliche physikalisch-technische Verfahren zum Einsatz (Krause, 1997;Maier et al., 1998), deren Grundprinzipien in **Abbildung 2, 4 und 5** schematisch dargestellt sind. Der Vollständigkeit halber ist auch die radiale Stoßwelle mit divergierendem Feld erläutert:

- **Elektrohydraulische Stoßwellenerzeugung (Abbildung 2 und 3):** Die Erzeugung extrakorporaler Stoßwellen mittels elektrohydraulischer Quelle erfolgt durch Funkenentladung einer Elektrode. Durch die Funkenentladung entstehen in dem die Elektrode umgebenden Medium Plasmablasen. Das Medium wird durch Plasmablasen komprimiert, wodurch es zur Entstehung von Druckwellen (Stoßwellen) kommt. Die sich sphärisch ausbreitenden Druckwellen werden über einen elliptischen Spiegel reflektiert, gebündelt und auf den Brennpunkt fokussiert.
- **Elektromagnetische Stoßwellenerzeugung (Abbildung 4):** Bei der elektromagnetischen Stoßwellenerzeugung wird eine Metallmembran von einer elektrisch aufgeladenen Spule abgestoßen, wobei die Metallmembran ihrerseits das umgebende Medium komprimiert. Die hieraus entstandenen Stoßwellen werden durch eine akustische Linse fokussiert.
- **Piezoelektrische Stoßwellenerzeugung (Abbildung 5):** Extrakorporale Stoßwellen können auch piezoelektrisch durch in einem elektrischen Feld oszillierende Quarzkristalle erzeugt werden. Durch einen sphärischen Umwandler werden die Stoßwellen gebündelt und fokussiert.
- **Ballistisches Prinzip:** Mittels Pressluft wird ein Projektil in einem Lauf innerhalb kurzer Zeit beschleunigt und auf einen Applikator geleitet. Der dort entstandene akustische Energieimpuls wird in das Gewebe eingekoppelt und fortgeleitet. Hierbei entsteht eine sich radiär ausbreitende Stoßwelle, mit dem Applikator selbst als Fokuspunkt. Da größere Energieflussdichten nur im oberflächlichen Gewebe vorkommen, ist die Anwendung auch auf diesen Bereich beschränkt. Während diese Methode in der Orthopädie deshalb seltener angewendet wird, werden in der Dermatologie damit Studien durchgeführt und Behandlungen getestet.

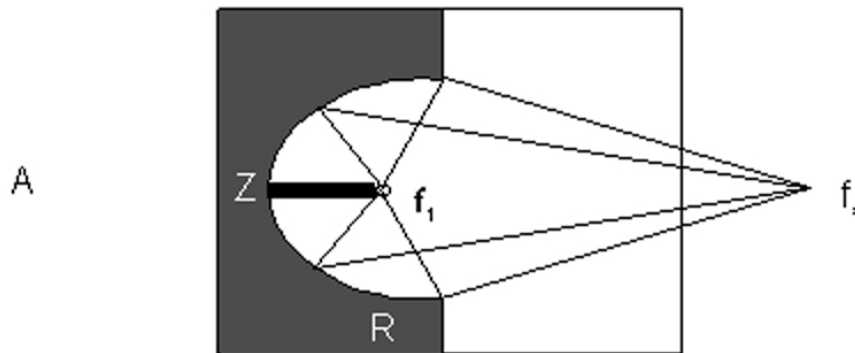


Abbildung 2:
Elektrohydraulische Stoßwellenquelle im Querschnitt.
Z=Zündkerze, R=Reflektor, f_1 =erster Fokuspunkt, f_2 =zweiter Fokuspunkt.



Abbildung 3:
Funkenelektrode mit elektrohydraulischer Koppelung. Durch Entstehung einer Plasmablase breitet sich die Stoßwelle im Medium Wasser aus und wird am Reflektor gebrochen (Originalelektrode aus dem Versuch).

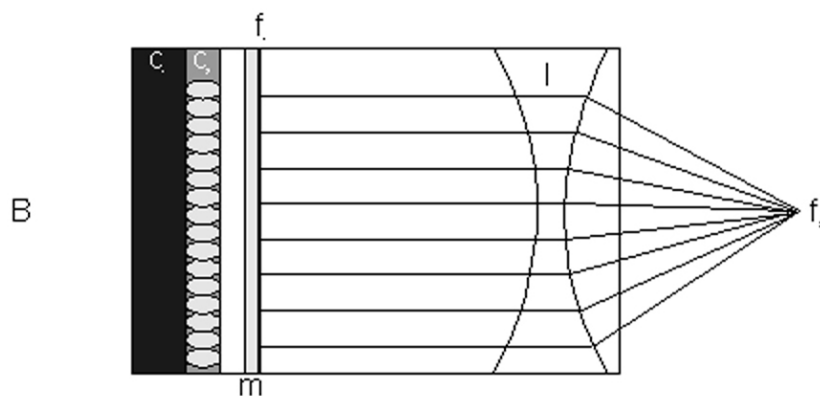


Abbildung 4:
Elektromagnetische Stoßwellenquelle. C_1 =Kondensator, C_2 =Spule, m =Membran, l =Linse, f_1 =erster Fokuspunkt, f_2 =zweiter Fokuspunkt.

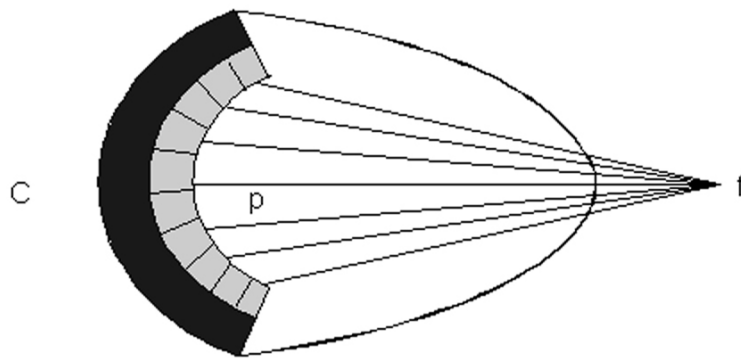


Abbildung 5:
Piezoelektrische Stoßwellenquelle. p=Piezokristalle,
f=Fokuspunkt.

In dieser Arbeit fanden die Versuche ausschließlich unter Verwendung einer **elektrohydraulischen Stoßwellenquelle** (Typ XL1, Dornier Medizintechnik, Wessling, Deutschland) statt. Der technische Aufbau dieser Stoßwellenquelle wird im Detail bei Graff (1989) und Delius et al. (1995) erläutert. Wie oben beschrieben handelt es sich um eine Funkenentladung über zwei Elektrodenspitzen unter Wasser (**Abbildung 3**). Die Ankopplung an die Zielregion erfolgt über deionisiertes und entgastes Wasser.

Eine konstante Beobachtung und Kontrolle des fokussierten Zieles wird durch die aus Plexiglas bestehenden Wände des Wasserbeckens möglich. Die Feinjustierung der Zielregion basiert auf zwei zueinander rechtwinklig angeordneten Lasern, die im Fokus f_2 (**Abbildung 2**) zusammenlaufen und diesen so optisch markieren.

2.1.3. Akustische Felder und deren Ausbreitung

Die beschriebene Fokussierung extrakorporaler Stoßwellen erzeugt ein dreidimensionales Stoßwellenfeld, das eine komplexe räumliche und zeitliche Verteilung des positiven und negativen Druckes aufweist (**Abbildung 6 für hohe und 7 für niedrige Energien**). Ein wichtiger Parameter dieses Stoßwellenfeldes ist sein Fokus, der eine zigarrenähnliche Gestalt

aufweist. Zwischen der Form des Fokus und der physikalischen Parameter der Welle (P_+ , P_- sowie der Energieflussdichte [siehe unten]) bestehen komplexe Wechselbeziehungen (Ueberle, 1997; Wess et al., 1997). Alle auf dem Markt verfügbaren Stoßwellenquellen bündeln die akustische Energie in kleinen Arealen, um einerseits die Effekte innerhalb des Zielgebietes zu erhöhen und andererseits das umgebende Gewebe vor möglichen unerwünschten Nebenwirkungen so weit als möglich zu schützen.

Die **Energieflussdichte** extrakorporaler Stoßwellen ist definiert als derjenige Betrag der Stoßwellenenergie, der innerhalb einer Fläche von einem Quadratmillimeter der Fokuszzone eines akustischen Feldes gemessen wird. Die Maßeinheit der Energieflussdichte ist Millijoule pro mm^2 [mJ/mm^2].

Wie in Gleichung 1 gezeigt, wird die Energieflussdichte als Pulsintensitätsintegral (PII) in der gemessenen Fokuszzone berechnet:

$$(1) \quad PII = (1 / Z) * \int_T p^2(t) dt$$

Dabei steht Z für die akustische Impedanz eines Mediums, p für den akustischen Druck und t für das untersuchte Zeitintervall. Je nachdem, ob für t das in **Abbildung 1** dargestellte Zeitintervall I_+ oder aber I herangezogen wird, wird die Energieflussdichte entweder als “positive Energieflussdichte” (ED_+) oder als “Gesamtenergieflussdichte” (ED) angegeben.

In Kapitel 2.1.4. wird genau erläutert, warum (in peer-reviewed publizierten Studien zur Applikation extrakorporaler Stoßwellen am Stütz- und Bewegungsapparat) die Energieflussdichte inzwischen die am häufigsten verwendete Einheit und genaueste Methode zur Quantifizierung der applizierten Energie ist. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde diese Messmethode zur aussagekräftigen Charakterisierung der applizierten Stoßwellen herangezogen.

Abhängig von der räumlichen Druckverteilung im Gewebe werden mehrere Fokuszonen (**Abbildung 6 und 7**) definiert.

Einerseits wird die Fokuszone als derjenige Raum bestimmt, in dem mehr als 50% des positiven Spitzendrucks (P_+ , Abb. 1) gemessen werden. Andererseits wird diese Zone auch als -6 dB Fokus (f_{6dB}) bezeichnet. Sie hat, wie oben erwähnt, die Form einer Zigarre und kann durch ihre drei Halbachsen f_x , f_y , und f_z beschrieben werden (**Abbildung 6 und 7**) (Wess et al., 1997).

Eine weitere Definition für den Fokus orientiert sich an dem Bereich, an dem der Druck über 5 Megapascal liegt (f_{5MPa}). In der medizinischen Anwendung ist der Fokus größer als der -6 dB Fokus. Die Messung des -6 dB Fokus kann auf relativen Druckwerten beruhen, während zur Messung des 5 MPa Fokus absolute, also kalibrierte Messungen nötig sind.

In der klinischen Anwendung wird zusätzlich auch der 5-mm-Fokus (f_{5mm}), der unabhängig von der Stoßwellenenergie auf 5 mm begrenzt wird (Wess et al., 1997), verwendet.

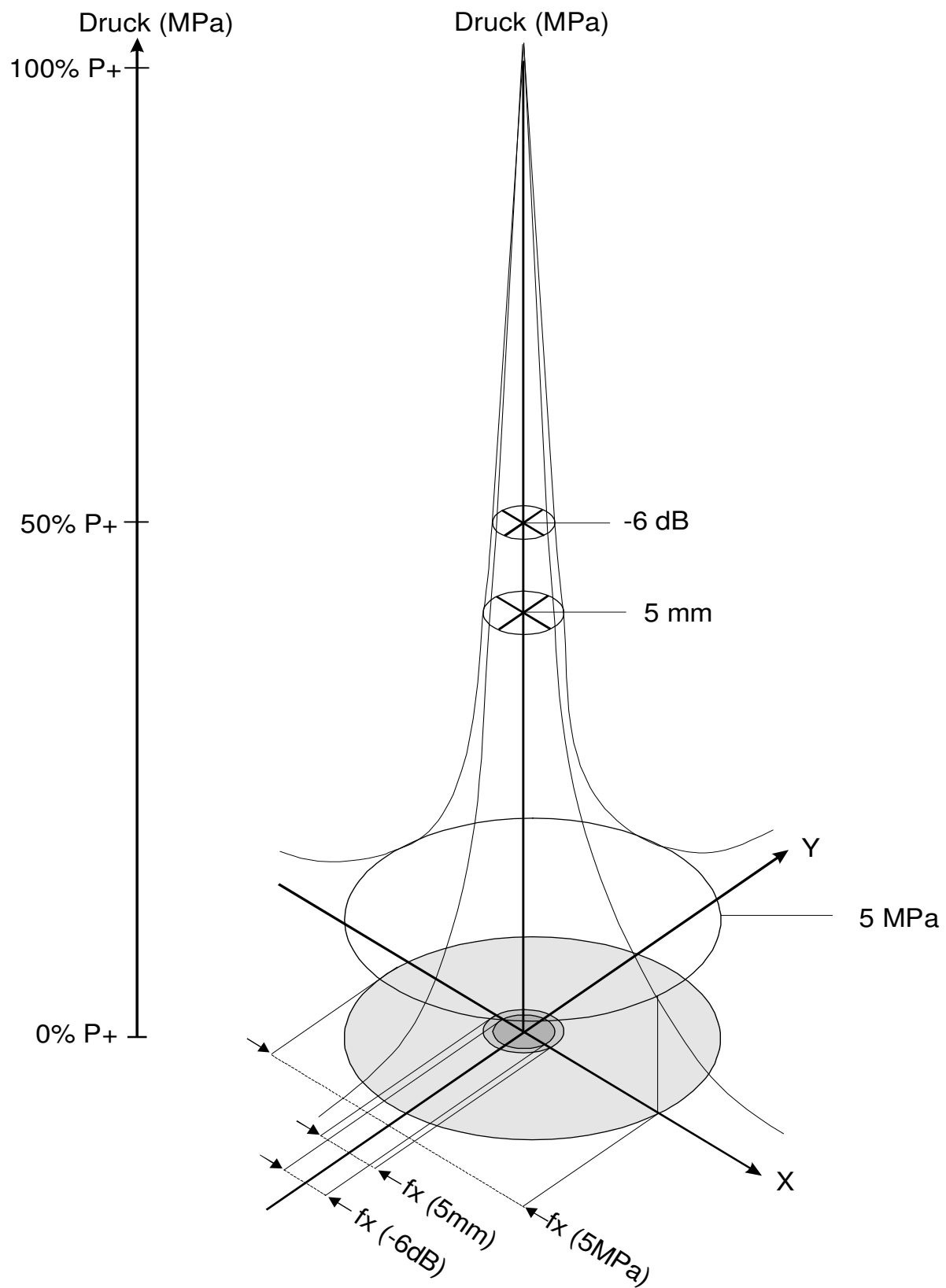


Abbildung 6:
Darstellung der räumlichen Ausbreitung (f_x , f_y) des -6 dB Fokus (dunkelgrauer Kreis), 5 mm Fokus (mittelgrauer Kreis) und 5 MPa Fokus (hellgrauer Kreis) bei hohen Energieflussdichten.

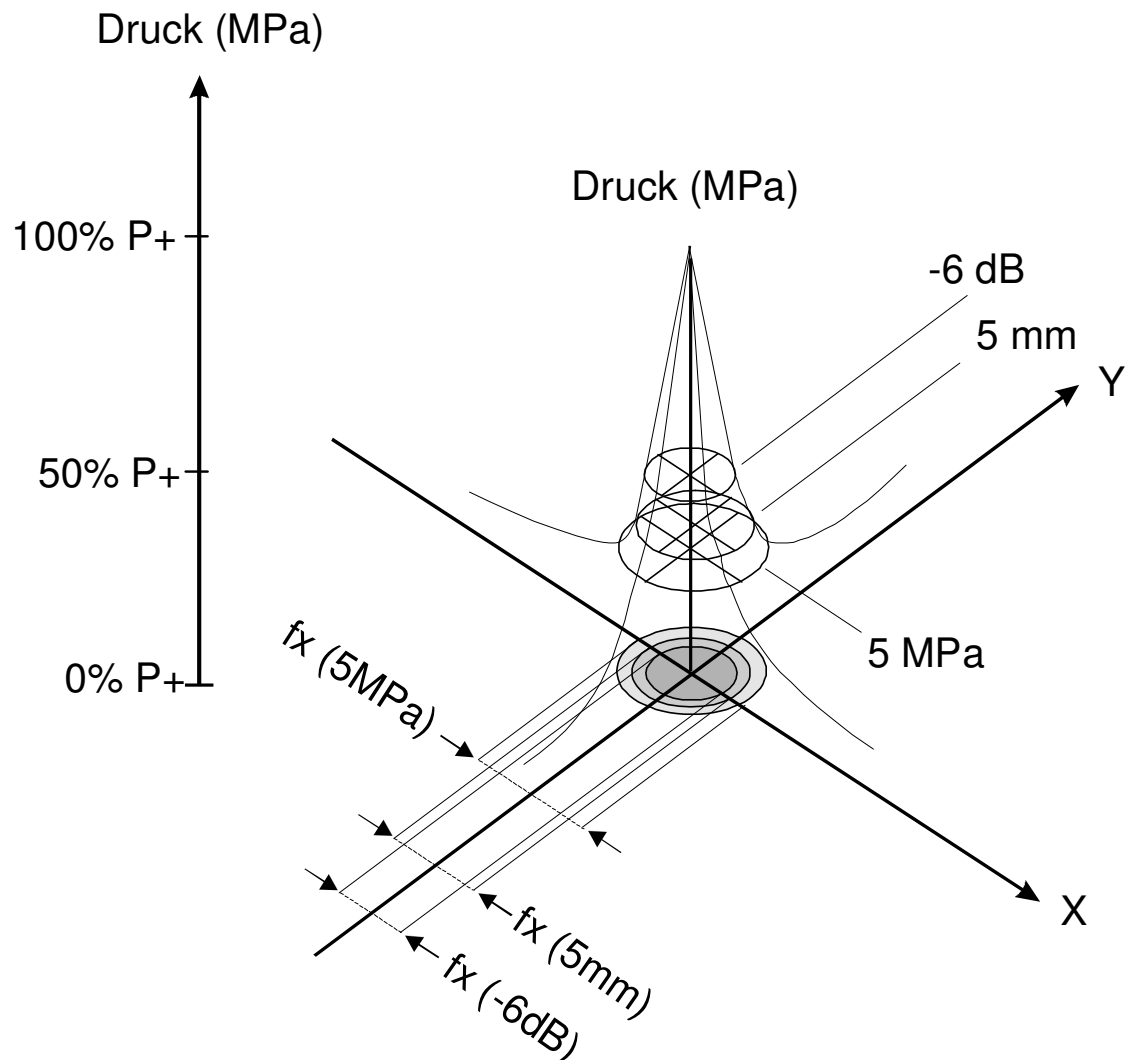


Abbildung 7:
Darstellung der räumlichen Ausbreitung (f_x , f_y) des -6 dB Fokus (dunkelgrauer Kreis), 5 mm Fokus (mittelgrauer Kreis) 5 MPa Fokus (hellgrauer Kreis) bei niedrigen Energieflussdichten.

2.1.4. Methoden zur Druckmessung

Zur Charakterisierung der Stoßwellen wurde ursprünglich die zu ihrer Erzeugung benötigte Generatorspannung (Kilovolt [kV]) oder auch der maximal mögliche positive Druck (P_+) im Fokusgebiet verwendet. Allein die Angabe der Generatorspannung lässt jedoch keinen vernünftigen Rückschluss auf die **Energieflussdichte** der Stoßwelle zu.

Dieser Parameter ist abhängig vom Mechanismus der Erzeugung (elektrohydraulisch, elektromagnetisch oder piezoelektrisch) und der jeweiligen Bauart der Stoßwellengeneratoren (Gerdesmeyer et al., 2002; Maier et al., 1998) sowie dem Ankoppelungsmedium.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, für jede Stoßwellenquelle und Geräteeinstellung die exakte Energieflussdichte im Zielfokus zu messen:

- < **Glasfaserhydrophone:** Die Glasfaserhydrophone bestehen aus einer Laserlichtquelle, welche an eine Glasfaser (Fiberoptik) gekoppelt ist. Die Spitze der Glasfaser wird in das akustische Feld eingebracht. Die auftreffende Stoßwelle verändert die Dichte der Glasfaserspitze, was zu Änderungen der Intensität des reflektierten Laserlichts innerhalb der Glasfaser führt. Mittels einer Fotodiode wird diese Intensitätsänderung erfasst. Glasfaserhydrophone weisen eine lange Lebensdauer auf.
- < **Piezoelektrische Kristallhydrophone:** Für diese Art von Messung waren es die ersten Geräte, die als Druckaufnehmer zur Verfügung standen. Sie bestehen aus piezoelektrischen Kristallen unterschiedlicher Größe. Diese Sensoren erlauben jedoch keine reproduzierbaren Messungen in streng fokussierten Feldern, unter anderem da der Druckaufnehmer größer ist als der Stoßwellenfokus (Coleman et al., 1998; Staudenraus and Eisenmenger, 1993). Heute werden sie nur noch zur Konstanzprüfung des Stoßwellendruckes verwendet.
- < **Piezoelektrische Polymermembranen aus Polyvinylidendifluorid (PVDF):** Gegenüber den piezoelektrischen Kristallhydrophonen weisen die Geräte sehr kleine Druckaufnehmer auf. Punktgenaue Messungen sind somit möglich. Nachteilig sind vor allem die hohen Kosten.

- < **PVDF Metallnadeldruckaufnehmer:** Deutlich geringere Kosten und höhere Lebensdauer weisen diese mit einer PVDF Schicht überzogenen, dünnen Metallnadeln auf. Der einzige Nachteil dieser Geräte besteht in einer komplexen Wechselwirkung zwischen der extrakorporalen Stoßwelle und der Metallnadel. Deshalb kann P- nicht ganz exakt gemessen werden (Folberth et al., 1992). Zwar trägt P- nur 10% bis 20% zur Gesamtenergieflußdichte bei, aber hierunter fällt auch die Kavitation-Wirkung.

Bei den in der vorliegenden Arbeit mit der elektrohydraulischen Stoßwellenquelle (Typ XL1, Dornier Medizintechnik, Wessling, Deutschland) durchgeführten Probemessungen wurden alle Druckmessungen mit PVDF Metallnadeldruckaufnehmern durchgeführt. Dabei stimmten die ermittelten Werte unter Berücksichtigung der bekannten Messungenauigkeit bei PVDF (10%) gut mit denjenigen Werten überein, die von Delius et al. (1998) für die identische Stoßwellenquelle mit fiberoptischen Hydrophonen ermittelt wurden.

2.1.5. Biologische Wirkung im Gewebe

Die Effekte der extrakorporalen Stoßwelle auf das umliegende Gewebe beruhen auf einem direkten und einem indirekten Mechanismus (Delacretaz et al., 1995; Delius, 1994).

Direkter Stoßwelleneffekt:

Dieser Mechanismus tritt an Grenzflächen zwischen Medien (Gewebe oder Fremdmaterial) unterschiedlicher akustischer Impedanz auf. Die akustische Impedanz eines Mediums ist definiert als das Produkt seiner Dichte und der Schallgeschwindigkeit innerhalb des Mediums oder als die SI-Einheit der akustischen Impedanz (Schallkennimpedanz = Z_F). Letztere ist Newton mal Sekunde pro Kubikmeter [Ns/m^3], also [$Z_F = \text{Ns/m}^3$] und beschreibt damit das Verhältnis von Schalldruck zu Schallschnelle.

In **Tabelle 1** sind die akustischen Impedanzen verschiedener Materialien zusammengefasst. Extrakorporale Stoßwellen werden an Grenzflächen mit unterschiedlicher Impedanz gebrochen, wobei physikalisch gesehen eine Reflexion und eine Refraktion auftreten. Dies führt zur

Freisetzung kinetischer Energie an der von den Stoßwellen passierten Grenzfläche.

Die Freisetzung der kinetischen Energie an Grenzflächen unterschiedlicher Impedanz ist von zentraler Bedeutung für die Applikation extrakorporaler Stoßwellen am Stütz- und Bewegungsapparat. Der beachtliche Unterschied bezüglich der akustischen Impedanz zwischen Muskelgewebe und Knochen führt zu Freisetzung kinetischer Energie an der Periost-Knochen-Grenze.

Auch zwischen Lungen- und Muskelgewebe bzw. Knochen liegt ein weiterer Impedanzunterschied vor, weshalb zum Beispiel die Applikation von Stoßwellen im Bereich des Thorax grundsätzlich kontraindiziert ist.

Indirekter Stoßwelleneffekt:

Die indirekte Kraftentfaltung wird durch den Mechanismus der Kavitation vermittelt (Bailey et al., 1999; Delius et al., 1995; Delius et al., 1998). Kavitation ist definiert als die Bildung und Auflösung von Blasen in Flüssigkeiten bei Druckschwankungen.

Zu Beginn des in **Abbildung 1** gezeigten Zeitintervalls **B**, d.h. in der Phase des negativen Druckes einer Stoßwelle, kommt es zur Gasbildung und Vakuumbblasenentstehung im beschallten Medium. Gas, gelöst in der umgebenden Flüssigkeit, sammelt sich innerhalb der Vakuumbblasen, die sich im Verlauf des Zeitintervalls **B** um ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größe ausdehnen. Am Ende des Zeitintervalls **B** kommt es durch Rückkehr auf den Umgebungsdruck zum implosionsartigen Kollaps der Blasen (**Abbildung 8**) und so zu stärksten Druckstößen mit kurzzeitigen Druckspitzen und hohen Strömungsgeschwindigkeiten der lokalen Flüssigkeit.

Bei dem besonderen Fall an Grenzflächen unterschiedlicher Impedanz können die durch Implosion bedingten kleinsten Wasserströmungen sogenannte “Mikrojets” durch die implodierende Blase hindurch ausbilden. Dies führt zu kurzzeitiger und hoher mechanischer Belastung an der Grenzfläche und zur Zerstörung von Gewebe.

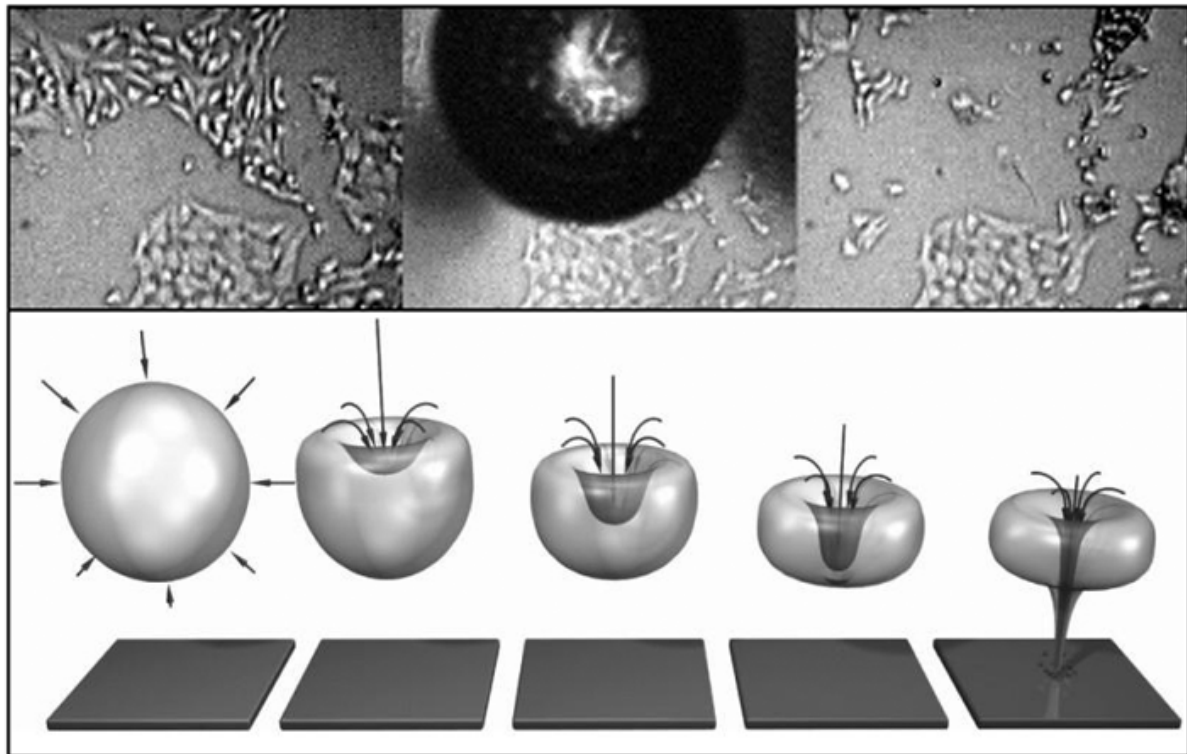


Abbildung 8: Thema Kavitationsblase.

Im oberen Filmstreifen ist eine Zellkultur auf fester Unterlage zu sehen. Auf dem mittleren Bild handelt es sich bei dem kugelförmigen Objekt um eine Kavitationsblase, die zeitlich gesehen in den Zuganteil der Stoßwelle (zum Umgebungsdruck relativer Unterdruck) fällt. Nach Wiedererreichen des Umgebungsdruckes imponiert eine Jet-bedingte Zerstörung der Zellkultur. Im unteren Filmstreifen ist ebenfalls eine Kavitationsblase dargestellt. Die kugelförmige Kavitationsblase links fällt zeitlich auf den größten negativen Anteil der Zugwelle, die folgenden Schemazeichnungen zeigen die Rückkehr zum Umgebungsdruck und den dabei entstehenden Flüssigkeits-Jet (Micro-Jet). Diese Jets mit ihrer zerstörerischen Wirkung entstehen hauptsächlich an Grenzflächen durch komplexe Druckverhältnisse. (O. Wess, J Mineralstoffwechsel 2004; 11; 7-18)

Das Verhältnis zwischen direkten und indirekten Effekten bezüglich der biologischen Wirkung extrakorporaler Stoßwellen wird gegenwärtig untersucht und ist noch nicht abschließend geklärt (Ogden et al., 2001b; Williams, Jr. et al., 1999b; Williams, Jr. et al., 1999a). Grundsätzliches zur Kavitation ist von Philipp (Philipp and Lauterborn, 1998) ausführlich beschrieben worden.

Material/Gewebe	Schallgeschwindigkeit m/s	Akustische Impedanz Z_F [$\times 10^3 \text{ Ns/m}^3$]
Luft	343	429
Fett	1450	1380
Wasser	1483	1480
Lunge	650-1160	260-460
Leber	1560	1650
Muskel	1545-1630	1650-1740
Knochen	2700-4100	3200-7400
Nierenstein	4000-6000	5600-14400

Tabelle 1

Schallgeschwindigkeit und akustische Impedanz verschiedener Materialien und Gewebe (ohne Temperaturangabe, aus Krause 1997)

2.2. Die Pseudarthrose

2.2.1. Definition und Erscheinungsformen

Die Pseudarthrose ist definiert als falsche Gelenkbildung und dem Ausbleiben einer knöchernen Überbrückung im Anschluss an eine Fraktur oder Osteotomie nach einer Zeitspanne von sechs (im amerikanischen Raum neun) Monaten. Ätiologie und Pathomechanismus sind noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand weiterer Forschung (Beam et al., 2002; Richter et al., 2000; Runkel and Rommens, 2000).

Grundsätzlich besteht heute aber Einigkeit darüber, dass es sich bei der Entstehung in der Regel um ein multifaktorielles Geschehen handelt (Runkel and Rommens, 2000). Chemische oder biologische Noxen unterschiedlicher Genese und Auswirkung sollen hier nicht weiter erörtert werden. Der hier beschriebene Teil behandelt ausschließlich die Ursachen der aseptischen Pseudarthrose und nicht der infizierten Pseudarthrose.

Die pathogenetischen Faktoren der aseptischen Pseudarthrose sind sowohl auf der mechanischen (1. Instabilität [mangelnde Ruhigstellung] und 2. mangelnder Fragmentkontakt) wie auch auf der biologischen Seite (3. Beeinträchtigung der Blutzufuhr) zu suchen (Rahmanzadeh and Meißner, 1991; Runkel and Rommens, 2000; Weber and Cech, 1973).

1) Instabilität:

Bei der primären Knochenbruchheilung erfolgt das Zusammenwachsen der Knochenenden direkt durch Trabekelbildung. Bei einer hohen mechanischen Belastung kann eine großflächige und direkte Überbrückung aber nicht stattfinden. Die neu gebildeten Osteone werden direkt geschädigt, es kommt zur Kallusbildung. Damit handelt es sich definitionsgemäß nicht mehr um die primäre Knochenbruchheilung.

Bei der sekundären Knochenbruchheilung erfolgt das Zusammenwachsen der Knochenenden

über die Zwischenstufe der Kallusbildung. Dieser Kallus durchläuft verschiedene Phasen wachsender Stabilität. Wichtig ist hier der Übergang vom Stadium des Faserknorpels zu dem des Faserknochens. Erstmals in diesem Stadium des Faserknochenaufbaus findet eine knöcherne Überbrückung, also wachsende Mineralisierung zwischen beiden Enden, statt. Wenn in dieser instabilen Phase die Elastizitätsreserve des Gewebes überbeansprucht wird, kann die notwendige Aushärtung nicht beendet werden.

2) Mangelnder Fragmentkontakt:

Dislokation, fehlende Fragmente und Interposition von Weichteilgewebe können durch einen mangelnden Knochenkontakt die Überbrückung verhindern. Oft reichen schon Defekte von wenigen Millimetern, um eine Pseudarthrose entstehen zu lassen. Dies geschieht häufiger im Bereich des spongiösen Knochens als im Röhrenknochen (Stürmer, 1996; Weber and Cech, 1973).

3) Beeinträchtigung der Blutzufuhr:

Jede Fraktur führt zu einer – zumindest mikroskopisch kleinen – Knochennekrose unmittelbar an der frakturierten Zone (Runkel and Rommens, 2000). Durch Beschädigung des Periosts bzw. Markraumes bei Frakturen mit einer Dislokation oder einem Weichteiltrauma ist die Durchblutung meistens stark beeinträchtigt. Eine Reduzierung der Blutzufuhr trifft gleichermaßen auch auf Stück- oder Trümmerfrakturen und Operationen mit größerer Weichteilmobilisierung zu. In die Auflistung der Ursachen für fehlende oder mangelnde Blutzufuhr reiht sich noch das traumatisch bedingte Weichteil-/Knochenmarksödem und im Extremfall das Kompartment-Syndrom ein.

Letztendlich stellen alle Ausprägungsformen einer akut verminderten Blutzufuhr nur einen Faktor dar, der die Entstehung der Pseudarthrose fördert, aber meistens nicht gänzlich allein bedingt.

Es ist davon auszugehen, dass definitionsgemäß nach einer Zeitspanne von über sechs Monaten in aller Regel eine Revaskularisation stattgefunden hat und Nekrosen die Ausnahme darstellen. Zur Beurteilung der Knochen vitalität (bei allen Formen der Pseudarthrose von atroph bis

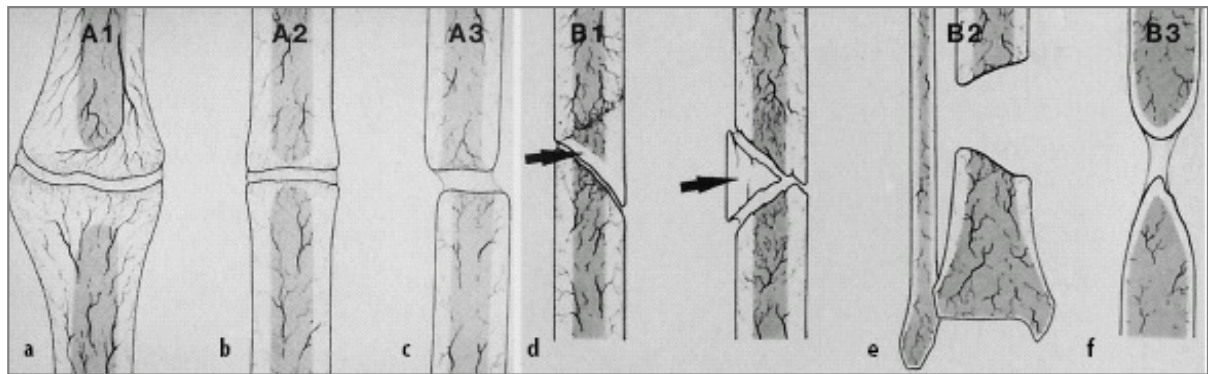


Abbildung 9: Klassifikation der Pseudarthrosen nach Weber und Cech, 1973.

Die Typen a) bis c) stellen die reaktiven Formen dar, während d) bis f) die avitalen, areaktiven Formen veranschaulichen. f) zeigt morphologisch die maximale Ausprägung der atrophischen Pseudarthrose.

hypertroph) wird auch häufig die auf dem Röntgenbild sichtbare Knochenresorption und damit auch bei der atrophischen Pseudarthrose eine suffiziente Blutversorgung postuliert (Weber and Cech, 1973).

In der Ausprägung wird heute noch immer (manchmal in leicht abgewandelter Form) die Klassifikation nach Weber und Cech aus dem Jahr 1973 verwendet (**Abbildung 9**). Im nächsten Absatz soll nur die **atrophe Pseudarthrose** behandelt werden, welche die Grundlage für unser Modell darstellt.

2.2.2. Die atrophe Pseudarthrose

Entsprechend der Einteilung von Weber und Cech, 1973, zählt die atrophe Pseudarthrose zu den avitalen Pseudarthrosen. Dieser Ansicht nach handelt es sich hierbei um Narbengewebe an der ehemaligen Bruchstelle, dem jegliche osteoneogenetische Potenz fehlt. Auch Runkel und Rommens (2000) sehen hier das Fehlen von reaktionsfähigem Gewebe. Morphologisch bzw. im Röntgenbild sieht man häufig eine Reduktion der Knochenmasse am Frakturspalt (**Abbildung 9**).

2.2.3. Klinische Relevanz

Je nach Alter des Patienten, Lokalisation am Skelett und Behandlungsmethode variiert die Häufigkeit einer Pseudarthrose, an der Tibia waren es in einer kleinen Serie (n=18) 16% (Eggli et al., 1998), in einer weiteren Serie 19% (Runkel and Rommens, 2000). Bei einem Patientengut mit ungünstigen Voraussetzungen (hohes Alter, Nikotinabusus, Grunderkrankung wie Diabetes mellitus, etc.) kann diese Rate aber auch höher liegen. Ein signifikanter Unterschied konnte bei Patienten mit chirurgischer Spondylodese durch Pseudarthroseraten um 40% bei Rauchern und nur 8% bei Nicht-Rauchern verdeutlicht werden (Brown et al., 1986).

Der Pseudarthrose kann aber auch im Einzelfall nicht genug Bedeutung beigemessen werden, da die restitutio ad integrum der entsprechenden Körperregion (damit auch die Wiedereingliederung in den Alltag) nach sechs Monaten und darüber hinaus dem Patienten nicht oder nur eingeschränkt gegeben ist. Hieraus ergibt sich die Dringlichkeit effizienter Behandlungskonzepte. Der Tibiaschaft, wie hier am Kaninchenmodell, ist einer der häufigsten Lokalisationen mit ca. 19% (Runkel and Rommens, 2000) und somit bei fehlender Kontraindikation für Studienzwecke gut geeignet.

2.2.4. Aktuelle Behandlungsstrategien

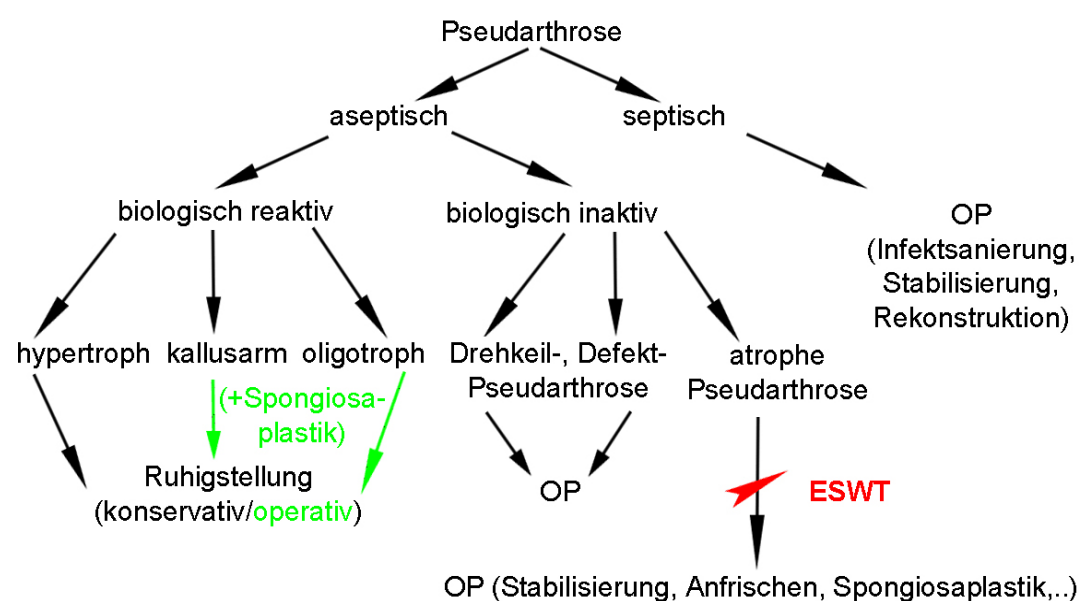


Abbildung 10: Algorithmus der aktuellen Behandlungsstrategie

Die Übersicht (**Abbildung 10**) zeigt Behandlungsstrategien, wie sie je nach individueller Entscheidung möglich sind. Dieser Algorithmus stellt nur eine vereinfachte Form dar.

Das Erkennen einer Pseudarthrose gestaltet sich oft als schwierig. Belastungsabhängiger, instabilitätsbedingter Schmerz und Schwellung im Frakturbereich sind typische Beschwerden einer Pseudarthrose. Es ist jedoch auch möglich, dass Patienten völlig symptomfrei sind. Bei der klinischen Untersuchung muss auf mögliche Achsen- und Rotationsfehler geachtet werden. Die benachbarten Gelenke sind sorgfältig zu untersuchen, da Bewegungseinschränkungen oder Einsteifungen sekundär durch eine Pseudarthrose verursacht werden können. Im Hinblick auf die Therapiewahl müssen die Weichteile sorgfältig inspiziert werden.

Bei Infektpseudarthrosen ist darauf zu achten, ob septische Allgemeinzeichen oder eine Fistelung vorliegt. Ulzerationen, periphere arterielle oder sensomotorische Ausfälle müssen im Hinblick auf die Wahl der Therapie berücksichtigt werden (Runkel and Rommens, 2000).

Für die Wahl der richtigen Therapieabfolge ist die Beurteilung der Lage essentiell, Klinik und Diagnostik müssen nach folgenden Kriterien abgefragt werden:

- < lokaler Hinweis auf Entzündung, laborchemische Entzündungsparameter
- < Achsenstellung und Knochenbeurteilung, Standardröntgen in zwei Ebenen
- < Stoffwechselsituation und bei unübersichtlichem Situs ergänzende Diagnostik, wie: CT- oder MRT-Untersuchungen zur Frage nach Frakturüberbrückung und Weichteilsituation, gegebenenfalls Szintigraphie zur Beurteilung der Durchblutungssituation

3. Material und Methodik

3.1. Modellaufbau

Ziel der Studie war es, am Modell der atrophen Pseudarthrose im Tierversuch die Wirkung der extrakorporalen Stoßwelle zu überprüfen. Die Tiere (Kap. 3.1.1.) wurden an der Tibia des rechten oder linken Hinterlaufs operiert, die Randomisierung erfolgte in Form eines Münzwurfs direkt vor der Operation (Kap. 3.1.2.).

Nach acht Wochen fand eine zweite Randomisierung statt, in die nur Tiere mit Pseudarthrose (nach Röntgenbeurteilung) eingeschlossen wurden (Tiermodell der atrophen Pseudarthrose von Brownlow und Simpson, Kap. 3.1.2.).

Bei **Gruppe A** handelt es sich um die Versuchsgruppe **mit extrakorporaler Stoßwellenbehandlung (ESWT)** (n=6) und bei **Gruppe B** um die Kontrollgruppe **mit Scheinbehandlung** (n=8), so dass insgesamt 14 Tiere in das Ergebnis mit einbezogen wurden (**Abbildung 11 und Tabelle 2**) (Kap. 3.1.3.).

Direkt vor der Stoßwellentherapie oder Scheinbehandlung und vier Wochen danach wurde an jedem Tier eine Knochenszintigraphie durchgeführt (Kap. 3.2.2.). Außerdem wurde direkt davor Blut abgenommen, sowie an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 danach. Das sofort abzentrifugierte Serum wurde eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht (Kap. 3.2.4.).

Nach Versuchsende wurden die Tiere mittels einer Überdosis Pentobarbital euthanisiert.

Induktion einer Pseudarthrose (PA)

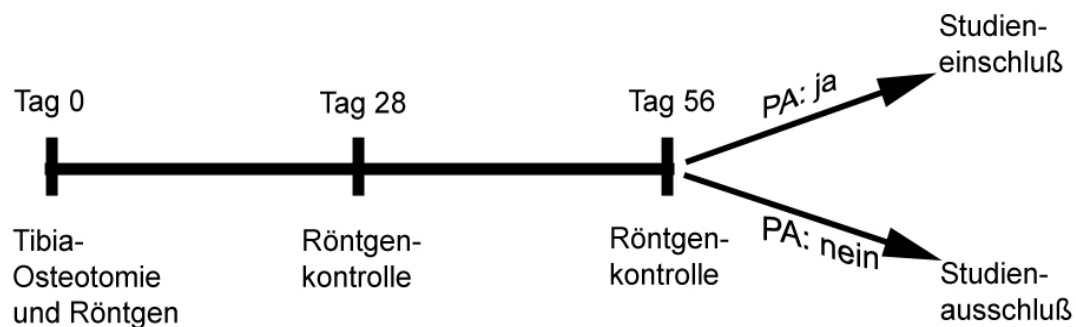


Abbildung 11:

Zeitlicher Verlauf bis zum Tag 56, (Ende der achten Woche). Bei röntgenologisch atropher Pseudarthrose findet der Studieneinschluß statt, das Tier wird in Gruppe A (mit Stoßwellenbehandlung [ESWT]) oder Gruppe B (ohne ESWT) randomisiert.

Zeitschema aller Untersuchungen, Tag 0 = ESWT/Scheinbehandlung				
	Energie	Röntgen	Blutentnahme	Szintigraphie
Gruppe A	0,5 [mJ/mm ²]	Tag -56, -28, 0, 14, 28	Tag 0, 1, 3, 7, 14, 28	Tag 0, 28
Gruppe B	0,0 [mJ/mm ²]	Tag -56, -28, 0, 14, 28	Tag 0, 1, 3, 7, 14, 28	Tag 0, 28

Tabelle 2

Zusammenfassung aller Untersuchungen, Tag 0 entspricht dem Tag der Randomisierung. Die ESWT oder Scheinbehandlung fand jeweils nach dem Röntgen (Tag 0) bzw. nach erster Blutentnahme und Szintigraphie statt. Röntgenuntersuchungen vor der ESWT stellen Verlaufskontrollen der Pseudarthrose-Entwicklung dar.

3.1.1. Versuchstiere

Die Versuchstiere waren insgesamt 14 ausgewachsene (Ex-Breeder, also nach Epiphysenfugenschluss), weibliche New Zealand White Kaninchen (NZW) mit einem Alter von 12 bis 18 Monaten. Die Tiere mit einem Gewicht von 3500 bis 4500 Gramm der Firma Charles River (Kisslegg, Deutschland) wurden im Institut für Chirurgische Forschung gehalten. Die NZW Kaninchen selbst wurden in Bodenhaltung maximal zu viert in einem separaten Käfig untergebracht, der aus einem Stall mit 2m² und einem nach außen hin halboffenem 8m² großen Hof besteht. Zur Fütterung wurde das Alleinfutter für Kaninchen (K-H der Fa. ssniff, Deutschland) und Wasser ad libitum angeboten. Zusätzlich erhielten die Tiere Karotten und Äpfel zur Auflockerung. In dem Versuchszeitraum von 12 Wochen herrschte ein 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Gewichtskontrollen wurden in regelmäßigen Abständen durchgeführt, um systemische Erkrankungen zu erkennen. Eine intensive Betreuung der Tiere war so gewährleistet.

Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter den von uns angegebenen Kriterien genehmigt und durchgeführt.

3.1.2. Operation zur Induktion einer Pseudarthrose

Der Tierversuch basiert auf dem Modell einer operativ herbeigeführten aseptischen atrophen Pseudarthrose und soll den beim Patienten vorherrschenden Zustand des lokal verminderten Gewebsstoffwechsels mit verminderter osteogener Potenz soweit als möglich nachahmen. Die Entwicklung des Modells entstammt zu einem erheblichen Teil einer etablierten Methodik (Brownlow and Simpson, 2000), die nach persönlicher Rücksprache mit den Autoren weiter modifiziert wurde. Das Prinzip war die unter aseptischen Bedingungen in Generalanästhesie herbeigeführte Tibia-Osteotomie mit lokaler Devaskularisierung und konsekutiver Stabilisierung unter Einsatz eines Fixateur externe. Anhand dieses Modells konnten die Autoren nach acht Wochen histologisch die Kriterien der atrophen Pseudarthrose mit areaktivem Bindegewebe und beginnender Knochenresorption an beiden Osteotomieenden nachvollziehen.

Die Details sind in der Veröffentlichung beschrieben (Brownlow and Simpson, 2000).

Anästhesie:

Zur OP-Vorbereitung wurden die Tiere durch intravenöse Generalanästhesie betäubt. Dafür wurde den Tieren über eine Ohrvene eine Venen-Verweilkanüle gelegt. Die Anästhesie wurde mit intravenöser Infusion von Xylazin (5,0 mg/kg Körpergewicht pro Stunde \times 5,84 mg Xylazinhydrochlorid) und Ketamin-Base (25 mg/kg Körpergewicht pro Stunde) durch eine Perfusor-Pumpe aufrechterhalten. Bei bekanntermaßen extremen Schmerzereignissen (Hautinzision, Knochenhautentfernung) wurde zeitlich begrenzt die Dosis beider Anästhetika verdoppelt. Als Volumenersatz erhielten die Tiere isotonische NaCl-Lösung. Während der gesamten Narkosedauer erhielten die Tiere Sauerstoff über eine Gesichtsmaske. Mit dem Verschließen der operierten Extremität wurde die Narkose beendet. Die Dauer der Narkose betrug ca. 20 Minuten in der Vorbereitungsphase und eine Stunde für die Operation.

Operation:

Zunächst wurde per Münzwurf die rechte oder linke hintere Extremität randomisiert. Für den operativen Zugang am Hinterlauf wurden die Haare mit einem geeigneten Langhaarschneider der Firma Aesculap (Tuttlingen, Deutschland) regional entfernt. Alle unvollständig rasierten Stellen im OP-Gebiet wurden weitestgehend mit einem Keratolyticum (pilcamed, Fa. ASID-BONZ, Deutschland) enthaart. Alle verwendeten Instrumente waren vorher dampfsterilisiert (bei 134 °Celsius, eine Stunde) worden. Das OP-Gebiet wurde fünf Minuten mit Kodan chirurgisch desinfiziert und der OP-Tisch steril abgedeckt. Zur Verminderung des Risikos einer intraoperativen bakteriellen Infektion erhielten die Tiere einmalig perioperativ intravenös Clindamycin (Sobelin® 20mg/kg KG, Pfizer-Pharma).

Mittels Stichinzision und Darstellung der Tibia wurden sechs Schanz'sche Schrauben mit 2,0 mm Durchmesser (an der Spitze auf 1,5 mm konisch zulaufend) in Kanäle eingebracht, die vorher mit einem 1,7 mm-Spiralbohrer von anteromedial her gebohrt wurden. Je zwei dieser Schrauben wurden mit einer Titan-Backe zusammengefasst und untereinander mit einem Titanträger (Mini-Fixateur, Fa. EBI, Parsipanny, USA) verbunden (**Abbildung 12 und 13**).

Zwischen den beiden distalen Backen (von insgesamt drei Backen) wurde nach einer weiteren Hautinzision die Tibiadiaphyse unter Schonung der Sehnen und Muskulatur freipräpariert. Zum Schutz der Weichteile wurden zwei Hohmann Haken um die Tibia gelegt. So konnte selektiv die Tibiadiaphyse mit der oszillierenden Knochensäge quer durchtrennt werden. Um eine lokale Devaskularisation zu erreichen, wurde distal und proximal der Osteotomie auf einer Strecke von 1 cm das Periost mit einem Rasparatorium (**Abbildung 12**) und das Endost sowie das Knochenmark mit einem scharfen Löffel entfernt.

Nach gründlicher Spülung zur Reduktion der osteogenen Potenz in der Region mit NaCl-Lösung wurde die Knochenlücke mit einer Distanz von 4 mm vom proximalen zum distalen Tibia-Osteotomieende (**Abbildung 13**) fixiert. Anschließend erfolgte die Hautnaht mit nicht resorbierbarem Faden (Mopylen). Das OP-Gebiet wurde mit sterilen Kompressen abgedeckt. Zum Schutz vor Biss wurde über die Kompressen eine Schicht Leukoplast gelegt. Nach 48

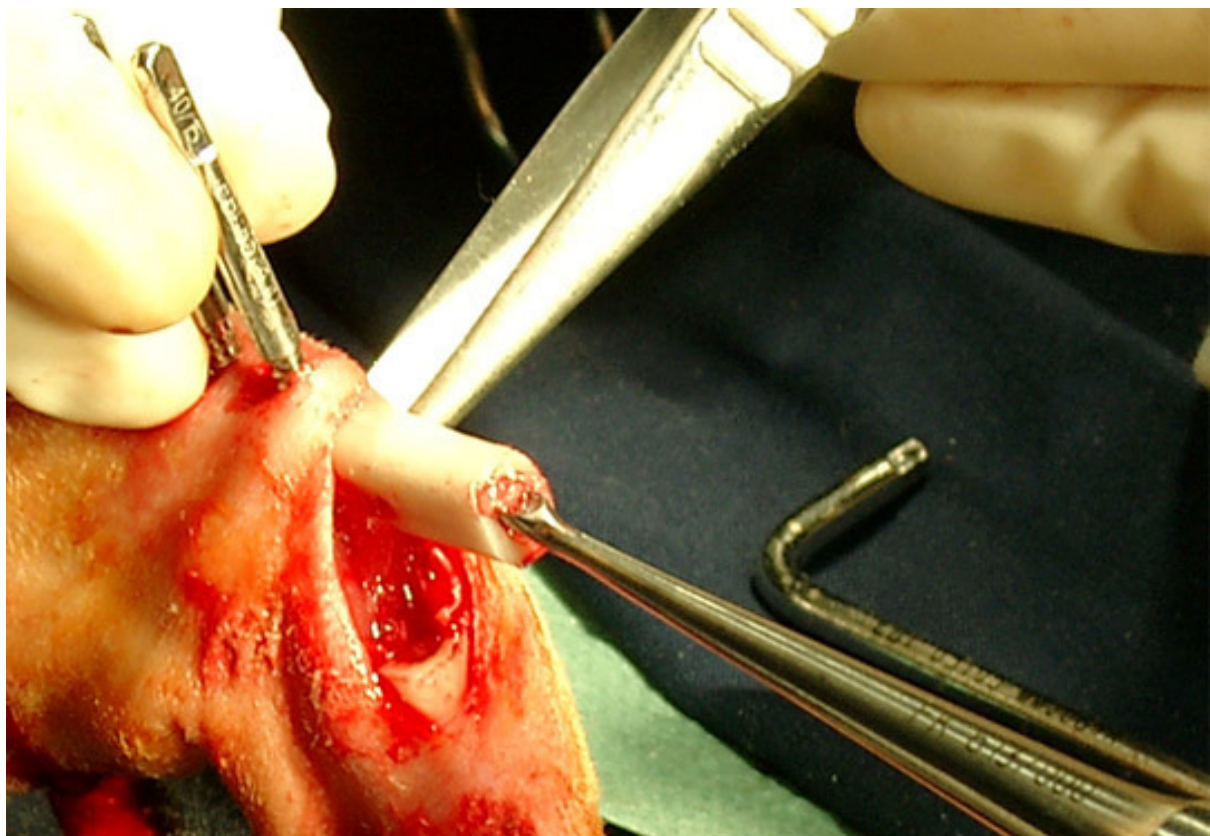


Abbildung 12: Entfernung des Knochenmarks und Periosts zur Reduktion osteogener Potenz mit einem scharfen Löffel.

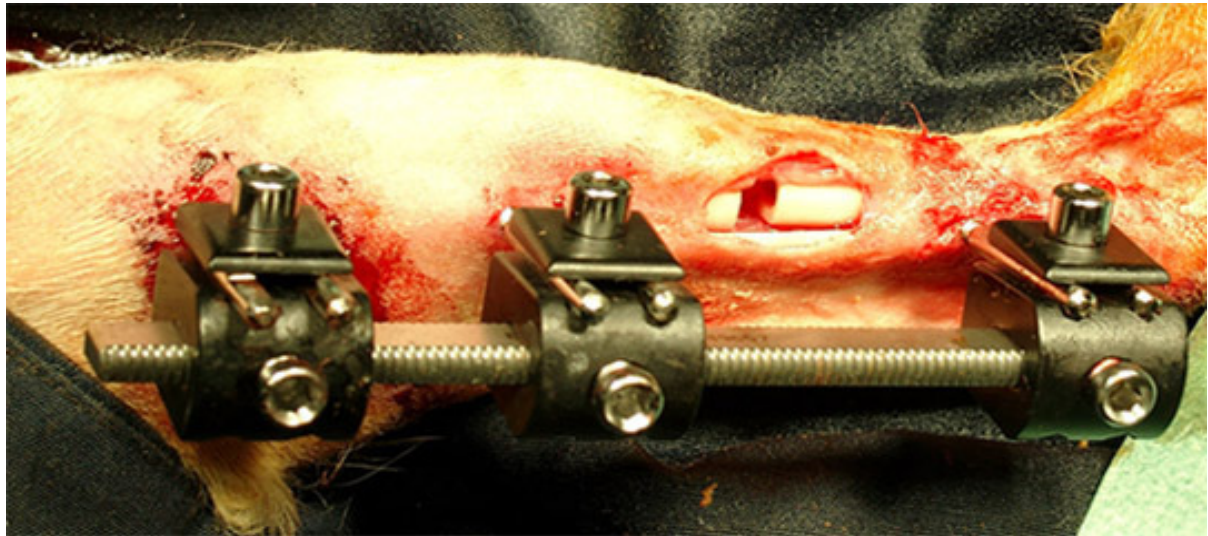


Abbildung 13: Osteotomie Operation zur Induktion einer Pseudarthrose vor dem Schließen des anteromedialseitigen Zugangs.

Stunden erfolgte die Abnahme des Verbandes und für einige Tage, von der Wundheilung abhängig, die Nachsorge mit Mercurchrom.

Schmerztherapie (Buprenorpin) erhielt jedes Tier für drei Tage post operativ, einzelne Tiere bei Bedarf auch etwas länger.

3.1.3. Applikation elektrohydraulisch generierter Stoßwellen

Die Stoßwellenapplikation wurde in intravenöser Generalanästhesie durchgeführt. Die Narkose wurde mit intravenöser Infusion von Xylazin (2,4 mg/kg Körpergewicht pro Stunde \times 2,8 mg Xylazinhydrochlorid) und Ketamin-Base (10,0 mg/kg Körpergewicht pro Stunde) eingeleitet und aufrechterhalten. Die Applikation erfolgte mittels einer Perfusorpumpe. Während des gesamten Zeitraumes der Narkose erhielten die Tiere Sauerstoff über eine Gesichtsmaske. Direkt nach der Stoßwellenapplikation wurde die Narkose beendet. Die Dauer der Narkose inklusive Vorbereitungszeit betrug ca. 35 Minuten.

Gruppe A (Stoßwellengruppe):

Applikator für die elektrohydraulisch erzeugte extrakorporale Stoßwelle (ESWT) war der

Experimental-Lithotrypter Typ XL1 der Firma Dornier (Weßling, Deutschland). Zur vereinfachten Positionierung der Tibia-Pseudarthrose in den Stoßwellen-Fokus wurde der Unterschenkel rasiert. Die Kaninchen wurden auf eine mit Schaumgummi gepolsterte Unterlage gebettet, die eine Aussparung für einen Hinterlauf aufwies. Durch diese wurde der zu behandelnde Hinterlauf geführt und an der Unterlagenunterseite mit einem Schaumstoffring fixiert. Kopf und Rumpf kamen oberhalb der Wasseroberfläche zu liegen, der zu behandelnde Unterschenkel war zur Ankoppelung an die Stoßwelle im Wasser (37,5 /C) gelegen (**Abbildung 14**).

So konnte über die Laser-Zieleinrichtung (mit zwei im Winkel von 90 Grad zueinander stehenden Laserpointern) die zu behandelnde Region der atrophen Pseudarthrose unter Sichtkontrolle über entsprechende Markierungen am Unterschenkel positioniert werden. Der Schnittpunkt der Laserstrahlen kennzeichnete den Stoßwellenfokus (**Abbildung 15**). Der Aufbau erfolgte weitgehend analog den Versuchen von Delius und Maier (Delius et al., 1995; Maier et al., 2001a). Zur Anwendung kam eine **Energieflussdichte** von 0,5 mJ/mm² (Maier et al., 2002a) bei einer Frequenz von 1 Hz, 15 kV und 1500 Stoßwellenimpulsen. Es wurden je 750 Impulse auf das proximale und das distale Pseudarthrosenende gerichtet.

Gruppe B (Kontrollgruppe):

Die Tiere wurden in gleicher Weise wie in Gruppe A vorbereitet, narkotisiert und positioniert. Die Stoßwellenquelle blieb allerdings während der gesamten Applikationszeit ausgeschaltet.

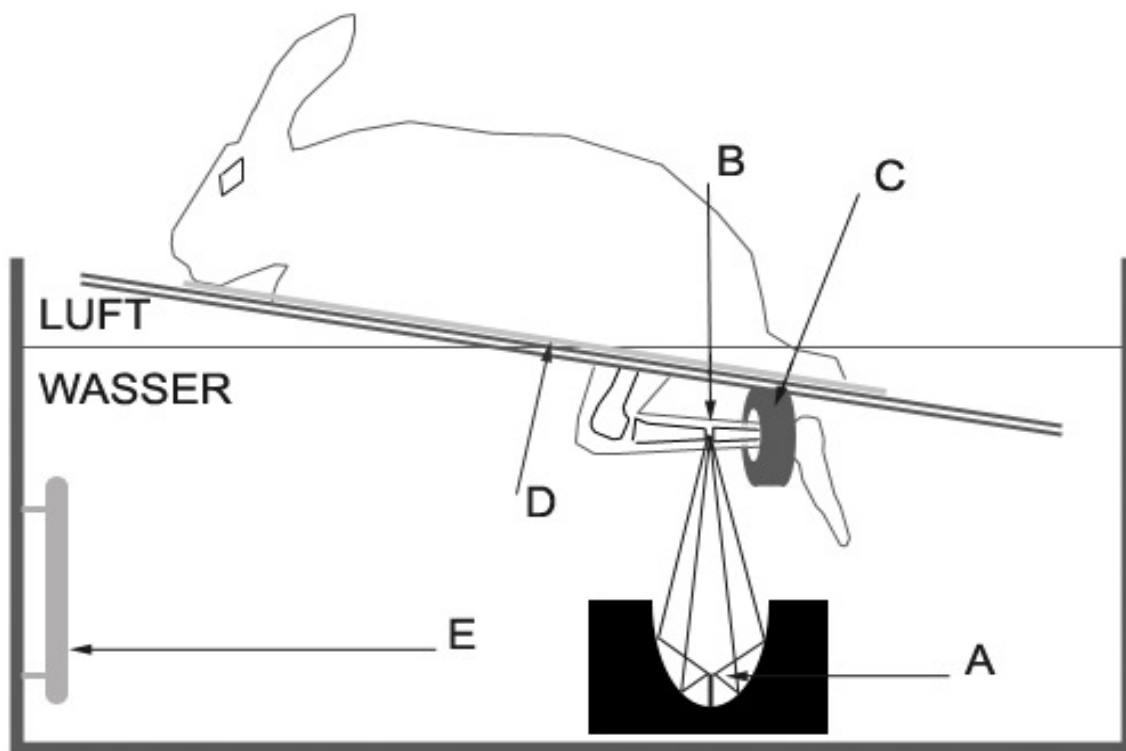


Abbildung 14:

Schema der elektrohydraulischen Stoßwellenbehandlung in einem Wasserbecken:

A) Elektrode zur Stoßwellenerzeugung. An dem ellipsoiden Reflektor werden die schematisch dargestellten Stoßwellen fokussiert.

B) Fokuspunkt an der Osteotomiestelle

C) Schaumstoffring zur Fixierung des Unterschenkels

D) Schaumstoffunterlage zur Polsterung mit Öffnung für den Hinterlauf

E) Wärmestab mit Schraube zur Temperaturregelung

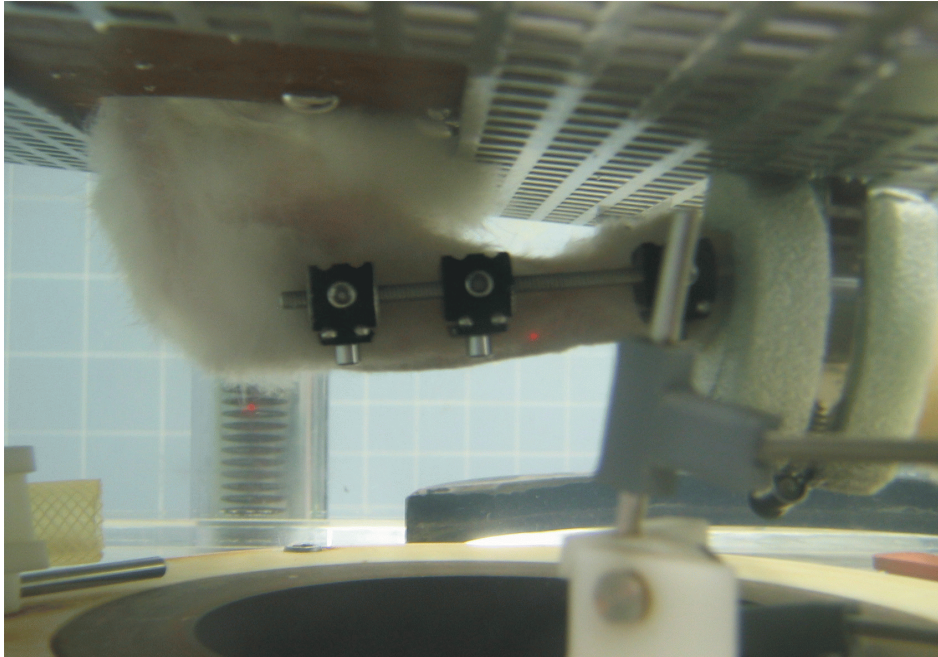


Abbildung 15:

Fixierter Unterschenkel, Positionierung der Pseudarthrose mittels zweier senkrecht zueinander stehenden Laserpointern (roter Punkt), die im Lot den Fokusbereich der Stoßwelle markieren. Ankoppelungsmedium ist körperwarm temperiertes Wasser, im Anschnitt unten ist das Ellipsoid zur Fokussierung der Stoßwelle zu sehen.

3.2. Methodik der Untersuchungen

Die Auswertung der Untersuchungen erfolgte grundsätzlich geblindet, d.h. der Auswertende hatte keine Information darüber, zu welcher Gruppe das entsprechende Tier gehörte.

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten in enger Kooperation mit Kollegen von entsprechend ausgewiesener Spezialexpertise. Dabei umfasste die Kooperation in allen Fällen das gesamte Experiment (Planung und Durchführung der Tierversuche, Messmethoden und Auswertung der digitalen Daten, Interpretation der Ergebnisse unter Berücksichtigung des jeweils aktuellen Standes der Literatur).

3.2.1. Röntgenuntersuchung

Die digitale Röntgenuntersuchung der Kaninchen wurde mit einem C-Bogen-Röntgengerät (Exposcop 8000, Fa. Ziehm) in antero-posteriorem und lateralem Strahlengang durchgeführt. Die Aufnahmespannung betrug 75 kV, die Stromstärke 3,7 mA. Die Durchleuchtung fand jeweils direkt nach der Osteotomie-Operation, nach weiteren vier, acht, zehn und zwölf Wochen statt.

Hierfür wurde immer die gesamte Tibia inklusive Fixateur externe und im proximalen Bereich vorhandene Fibula von zwei unabhängigen Untersuchern gewertet.

Als Kriterium für eine atrophe Pseudarthrose zum Zeitpunkt acht Wochen nach Osteotomie und zum Einschluss in die Studie zählten:

- < ein in der Länge erhaltener Osteotomiespalt
- < fehlende Überbrückung im Sinne eines kalzifizierenden Kallus bzw. ungerichtete Kalluswucherung
- < nur geringe dislocatio ad latus, maximal dem einfachen Kortikalisdurchmesser entsprechend.

3.2.2. Szintigraphische Messung: Mischphase und Statische Phase

Die Untersuchungen erfolgten in der bereits beschriebenen Narkose (Stoßwellenbehandlung, Kap. 3.1.3.), wobei die halbe Dosierung für Aufnahmen, frei von Artefakten durch Bewegungen der Tiere, ausreichend war.

Die Aufnahmen zur Skelettszintigraphie fanden für alle Tiere direkt am Tag vor (Tag 0) und achtundzwanzig Tage (Tag 28) nach extrakorporaler Stoßwellenapplikation statt. Hier wurde der lokale Blutfluss und der Knochenstoffwechsel anhand einer 3-Phasen-Szintigraphie mit ^{99m}Tc-Technetium-3,3-Diphosphono-1,2-Propandicarbonsäure (^{99m}Tc-DPD)(CIS bio international,

Frankreich) untersucht, wobei jedes Tier in gleicher Stellung in der Gamma-Kamera positioniert (E.CAM, Siemens Medical Systems, Deutschland) war. Dafür wurden die Tiere in Rückenlage mit parallel zueinander stehenden und ausgestreckten Hinterläufen zwischen den beiden LEHR-Kollimatoren (Low Energy High Resolution; Bildmatrix 128 mal 128 Pixel; Energiefeld mit einer Spannung von 140 Kiloelektronenvolt) fixiert. So konnte gleichzeitig eine anteriore (ventrale) wie auch eine posteriore (dorsale) Messung erreicht werden (**Abbildung 16**). Eine medial- und lateralseitige Aufnahme erschien wegen des mediallyseitig eingebauten Titanfixateurs wegen Artefaktbildung nicht sinnvoll.

In der Projektion war mindestens ein Ausschnitt von der Mitte des Femurs bis zu den Metatarsalia zu sehen, was eine anatomische und physiologische Beurteilung angrenzender Regionen zuließ. Über die Verbindung zu einem Computer wurde die erfasste Strahlung aufgezeichnet. Zeitgleich zum Start der Messung wurde den Tieren das ^{99m}Tc -DPD über eine Vene am Ohr injiziert. Gewichtsadaptiert erhielt jedes Tier eine Dosis, die zwischen 190 und 220 Megabecquerel [Mbq] lag.

Die Dosis wurde in Absprache mit der Nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums Großhadern der Universität München so gewählt, dass bei der geringen Größe des Kaninchenskelettes eine gute Auflösung durch hohe Zählraten erreicht wurde. Gemäß dem nach unseren Bedürfnissen abgestimmten Protokoll der 3-Phasen-Szintigraphie fanden folgende Aufzeichnungen statt:

- a) mit Beginn der Infusion des ^{99m}Tc -DPD eine Flow-(arterielle) Phase von insgesamt einer Minute Dauer. Diese wurde zur Beurteilung zeitlich kurzer Ereignisse in 30 mal zwei Sekunden dauernde Abschnitte unterteilt.
- b) eine direkt anschließende Misch-Phase mit venösem Pooling und beginnender Knochenresorption von zehn Minuten Dauer, unterteilt in jeweils 2-minütige Messungen.
- c) die statische Messung der Skelettszintigraphie wurde frühestens nach 120 Minuten und spätestens nach 140 Minuten gestartet. Aufgezeichnet wurde über eine Dauer von 10 Minuten, mit 5 jeweils zwei Minuten dauernden Messungen.

Durch die in kurzen Intervallen angefertigten Aufnahmen konnte eine Aktivitätsänderung über die Zeit hinweg verfolgt werden. Eine erneut angelegte Windel vor der Flow-/Misch- und der statischen Phase verhinderte die Artefakt-Bildung durch unkontrollierten Verlust von kontaminiertem Urin während der Narkose.



Abbildung 16:

Ansicht kurz vor der Messung mit der Gamma-Kamera (E-CAM, Siemens). Die beiden Kollimatoren (ventral und dorsal) wurden möglichst nahe an die in Parallelstellung fixierten Unterschenkel der Tiere gebracht. Um ein Verwackeln der Aufzeichnung zu verhindern, mussten die Tiere leicht intravenös sediert werden. Die Maske stellte eine ausreichende Sauerstoffzufuhr sicher.

3.2.3. Computergestützte Analyse der Szintigraphie

Die gesamte Auswertung der gespeicherten Daten erfolgte in der Nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums Großhadern in Zusammenarbeit mit dem zuständigen Physiker.

Bei dem Betriebssystem handelte es sich um ein Apple/Macintosh Standard MacOS. Darin integriert stand Software (Siemens Medical, Deutschland) zur Befundung von Aufzeichnungen nach dynamischen und statischen Protokollen zur Verfügung.

In einem ersten Schritt wurden für jedes Versuchstier die Daten beider Kollimatoren nach dem Verfahren des geometrischen Mittels übereinander projiziert und beide Informationen in einer gemeinsamen Datei zusammengeführt. Im Folgenden gibt es einen Überblick zur dynamischen und statischen Messung gefolgt von Informationen zur Methodik:

- A. Arterielle Phase:** Zuerst wurde der Flow der arteriellen Phase innerhalb acht Sekunden ab Erreichen des ^{99m}Tc -DPD der Arteria poplitea gemessen. Hierfür wurde die arterielle Flussgeschwindigkeit in den Unterschenkeln aller Kaninchen verglichen und daraus ein Acht-Sekunden-Standard-Intervall gebildet, so dass ein venöser Anteil minimal gehalten werden konnte. Rechnerisch wurden dazu die Summenwerte der vier mal zwei Sekunden-Bilder addiert.
- B. Misch-Phase:** Danach wurde eine Phase mit venösem und perivaskulärem Verteilungsvolumen nach 300 bis 540 Sekunden, angelehnt an Wallace (Wallace et al., 1992) aufgenommen. Ein geringer Anteil des Knochenstoffwechsels und auch extravasales Radionukleoid fließen dabei in das Ergebnis ein.
- C. Statisch:** Schließlich wurde eine statische Aufnahme des Knochenstoffwechsels nach 140 bis 160 Minuten (10 Minuten Messung) durchgeführt (Albanese et al., 1996; Gunalp et al., 1992).

Die **ROI**-Technik ("region of interest") diente als etablierte Standardmethode zur Auswertung

der lokal vorhandenen Radioaktivität. Verglichen wurde die Pseudarthrose-Seite mit der kontralateralen, gesunden Seite. Dabei wurde eine standardisierte Fläche von 12 mal 11 Pixel (132 Pixel-Matrix) verwendet, wobei die 11 Pixel sich auf die Tibialängsachse und die 12 Pixel auf die Tibiaquerachse beziehen. Bei der von uns gewählten Auflösung entspricht die ROI einer projizierten Kantenlänge von 28,8 (lateral) mal 26,4 (cranio-caudal) Millimeter. Dieses Feld wurde an jedes Tier individuell so angepasst, dass der zentrale Feldanteil direkt über der Pseudarthrose zu liegen kam.

Möglich war dies über den relativen Bezug zum individuellen Röntgenbild. Auf diesem waren die drei Bezugspunkte Kniegelenksspalt, Pseudarthrose und oberes Sprunggelenk sichtbar, woraus sich der Abstand zwischen Kniegelenksspalt und Pseudarthrose in einen Prozentwert bezogen auf die gesamte Tibialänge berechnen ließ. Durch die ebenfalls im Szintigramm abgrenzbare Gelenksspalte konnte die ROI genau auf der Pseudarthrose Region platziert werden.

Zu den Schanz'schen Schrauben des Fixateur extern konnten auf jeder Seite wenigstens sechs Millimeter Abstand gehalten werden, um den Einfluss des in der Schraubenregion veränderten Stoffwechsels auf die ROI gering zu halten. Unter Berücksichtigung dieser Fakten konnte eine möglichst große Fläche beobachtet werden, was wegen der Abbildungsungenauigkeiten der projizierten Fläche sinnvoll erschien.

Im Rahmen der Auswertung der arteriellen Flow- und der Misch-Phase wurde zusätzlich der gesamte Stoffwechsel beider Unterschenkel miteinander verglichen. Um dies zu erreichen, kam eine ROI mit 960 Pixel zum Einsatz, die ziemlich genau den Unterschenkel ab dem leicht abgrenzbaren Kniegelenksspalt bis zum Bereich des oberen Sprunggelenkes umspannte.

Das Aufnahmeverhalten von ^{99m}Tc -DPD der Seite der Pseudarthrose und der gesunden, kontralateralen Seite wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$UR = \frac{U_1}{U_2} \quad (\text{I})$$

UR bezeichnet die Uptake Ratio und gibt an, welche Seite mehr Radioaktivität aufnimmt. U_1 stellt die Zählrate in der behandelten Region und U_2 die Zählrate der unbehandelten Region dar.

Für die Messung am Tag 28 nach der Stoßwellenapplikation wurde der Versuchsaufbau wie am Tag 0 in entsprechender Anordnung wiederholt und mit Hilfe derselben Formel (I) die UR gemessen. Die UR beider Messungen wurde verglichen, woraus sich die Änderung der Radioaktivitätsaufnahme berechnen lässt. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$UR_{ges} = \frac{UR_{28}}{UR_0} \quad (II)$$

Die in Formel (II) aufgezeigte UR_{ges} bezeichnet dabei die geänderten Aktivitätsverhältnisse als Quotient von Tag 28 (UR_{28}) zu Tag 0 (UR_0) und ermöglicht damit den Vergleich im Verlauf bei unterschiedlicher Gesamtaktivität.

3.2.4. Untersuchung der Knochenwachstumsmarker im Serum

Am Tag direkt vor und am Tag 1, 3, 7, 14 und 28 nach Stoßwellenapplikation wurden zur gleichen Tageszeit von jedem Tier der Behandlungs- und Kontrollgruppe aus einer Vene am Ohr 3 bis 5 ml Blut abgenommen. Dieses wurde sofort im Anschluss in ein Serumröhrchen gefüllt. Das Blut wurde bei 4 /C eine halbe Stunde im Kühlschrank abgekühlt, um es im geronnenen Zustand in einer Zentrifuge zehn Minuten lang bei 3000 Umdrehungen/Minute in eine Serum- und Festkörperphase zu trennen. Das Serum wurde bei minus 80 /C eingefroren und am Ende der Versuchsreihe ausgewertet.

Der basic Fibroblast Growth Factor (**bFGF**) (Wang, 1996;Weiss et al., 2002), **Osteocalcin** (Seebeck et al., 2005;Weiss et al., 2002), Transforming Growth Factor β 1 (**TGF β 1**) (Kanaan and Kanaan, 2006;Wang et al., 2002;Weiss et al., 2002) und Vascular Endothelial Growth Factor (**VEGF**) (Ferrara, 2004;Marchi et al., 2004;Street et al., 2002;Weiss et al., 2005) wurden nachgewiesen und quantifiziert.

Für alle Faktoren kamen ELISAs (Quantikine[®], Firma R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) zum Einsatz, Osteocalcin wurde mittels einem EIA Kits (Typ METRA[™], Quidel Corp., San

Diego, USA) bestimmt (Southwood et al., 2003; Weiss et al., 2002). Die Proben wurden mit dem Gerät EAR 400AT der Firma SLT-Labinstruments, Austria, eingelesen.

Die Messungen wurden als Doppelwertmessung durchgeführt, um eine größtmögliche Genauigkeit zu erzielen. Ausnahmen bildeten wenige Messungen, wo mangels Serummengende nur ein Einfachwert zu ermitteln war. Im Folgenden sollen nur die grundlegenden und soweit bis heute bekannten sowie anerkannten Informationen über die Funktion dieser hauptsächlich lokal wirksamen Faktoren stichpunktartig aufgeführt werden. Das Zeitprofil bezieht sich auf die Stadien der Knochenbruchheilung:

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor):

Vorkommen:

in Osteoblasten und Chondroblasten sowie Fibroblasten

Funktion:

fördert vor allem die Mitose von Osteoblasten und die Knorpelmatrix Synthese, die Entwicklung des Mesoderm, gilt aber auch als Stimulator der Angiogenese durch Chemotaxis

Zeitprofil:

in allen Stadien der Knochenbruchheilung

(Nakajima et al., 2001; Solheim, 1998).

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor):

Vorkommen:

Im Frakturspalthämatom wird es im Rahmen der Hypoxie unter anderem von Fibroblasten vermehrt ausgeschüttet, aber auch von mesenchymalen Stammzellen der Knochenmatrix und von Osteoblasten und Chondrozyten gebildet.

Funktion:

parakrine Angiogenese in unterschiedlichen Geweben und im Frakturbereich wie unter anderem auch autokrine Stimulation der Osteoblasten zur Knochenmatrixsynthese

Zeitprofil:

innerhalb der ersten Stunden und der ersten Tage lokaler Anstieg bis zum Vielfachen der ursprünglichen Konzentration, später Abnahme

(Ferrara, 2004;Mayer et al., 2005;Street et al., 2002;Weiss et al., 2005)

TGFβ1 (Transforming Growth Factor β1):

Vorkommen:

in Thrombozyten, Entzündungszellen und auch in Osteoblasten und Chondrozyten

Funktion:

In der frühen Heilungsphase bis hin zur ausreifenden Knochenmatrix, sowie vor allem der Knochenmatrix Produktion durch Osteoblasten und Chondroblasten, deren Differenzierung und Migration, stimuliert er die Proliferation der mesenchymalen Zellen. Weiter wird TGFβ1 eine konzentrationsabhängige Stimulation der VEGF-Produktion mit positiver Korrelation zugeschrieben.

Zeitprofil:

Ein klarer Zeitpunkt ist nicht auszumachen, es spielt sowohl in frühen als auch späteren Heilungsphasen eine Rolle.

(Bourque et al., 1993;Cho et al., 2002;Kanaan and Kanaan, 2006;Saadeh et al., 1999;Steinbrech et al., 2000)

Osteocalcin:

Vorkommen:

Synthese in Osteoblasten im Rahmen der Ausdifferenzierung, Einlagerung in Knochenmatrix

Funktion:

Regulative Funktion bei der Osteoblastenreifung und Synthese der Knochenmatrix, nicht abschließend geklärt. Regulation von Kollagenase-3 (Matrix Metalloproteinase-3 oder Stromelysin-1) mit Beteiligung am Knochenumbau. Postuliert wird auch ein reziproker Mechanismus zwischen Knochenmatrix und Osteoblasten, der noch nicht genau verstanden wird (D'Alonzo et al., 2002;Kremer et al., 1998;Sasaki et al., 2007).

Zeitprofil:

häufig Anstieg erst nach drei-vier Wochen, in einer Studie auch schon eine kurze Spitze nach wenigen Tagen, Hinweise für altersabhängige Unterschiede (Lu et al., 2005)

(Bowles et al., 1996;Ford et al., 2004;Hankemeier et al., 2001;Paccione et al., 2001;Seebeck et

al., 2005;Stoffel et al., 2007;Thompson et al., 2002;Weiss et al., 2002)

3.2.5. Statistische Analyse

Alle statistischen Tests wurden zweiseitig angegangen. Das Konfidenzintervall wurde bei 95% festgelegt. Je nach Aufgabenstellung wurden Werte oder Quotienten der einzelnen Gruppen miteinander verglichen, dies ist im jeweiligen Kapitel erläutert.

Als Test innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon-signed-rank-Test für verbundene Stichproben, die nicht normalverteilt sind, angewendet.

Zum Vergleich zwischen den Gruppen kam der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben, die nicht normalverteilt sind, zum Einsatz. Eine Signifikanz wurde für ein $p < 0,05$ festgelegt. Zur Berechnung kam das Programm Prism in der Version 3.02 der Firma GraphPad Software Inc., San Diego California, USA, www.graphpad.com, auf einem Windows XP Betriebssystem zum Einsatz.

4. Ergebnisse

4.1. Röntgenologische Beurteilung

Die Beurteilung der Röntgenbilder im anterior-posterior und lateralen Strahlengang wurde nach der folgenden Klassifikation vorgenommen. Die Beurteilung fand 4 Wochen post ESWT vs. Scheinbehandlung statt.

Röntgenologische Klassifikation:

- Klasse 1:** keine Durchbauung im Pseudarthrosespalt
- Klasse 2:** partielle Durchbauung im Pseudarthrosespalt
- Klasse 3:** komplette Durchbauung im Pseudarthrosespalt

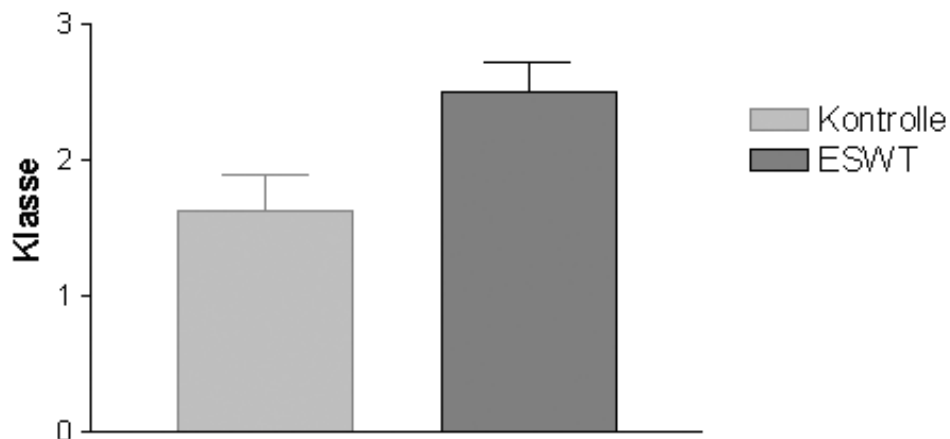


Abbildung 17: ESWT-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit berechneten Mittelwerten und Standardabweichungen der Mittelwerte für die Variable "Röntgenologische Beurteilung"

Drei Kaninchen und somit 50% der mit ESWT behandelten Tiere fanden sich in der Klasse 3, weitere 50 % in der Klasse 2 (**Abbildung 17**).

Vier Kaninchen (50%) der Kontrollgruppe waren in der Klasse 1 eingestuft, drei Kaninchen

(37,5%) in der Klasse 2 und ein Kaninchen (12,5%) in der Klasse 3.

In der statistischen Berechnung mittels des Mann-Whitney-Tests zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p < 0,0593$).

Für die Kontrollgruppe ohne ESWT beispielhaft in **Abbildung 18**:

ein Kaninchen mit der Nummer 2371. In den a.p.-Aufnahmen ist der Pseudarthrosespalt gut zu erkennen, eine Kallusbildung findet sich nicht. Die erste Aufnahme entstand direkt vor der Scheinbehandlung, die rechte Aufnahme ist vier Wochen danach gemacht worden.

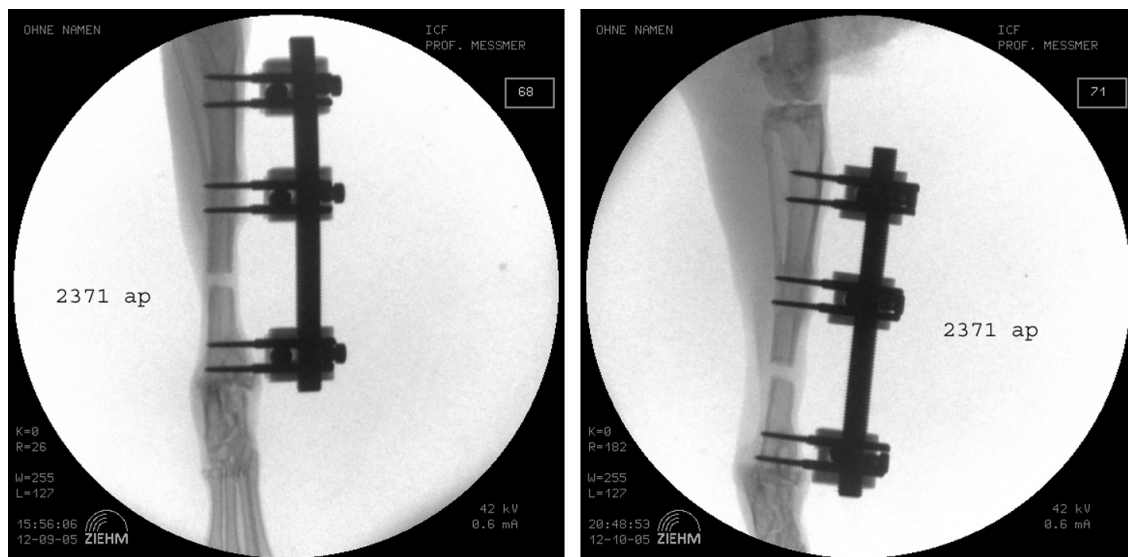


Abbildung 18:
Kaninchen 2371 aus der Kontrollgruppe: links direkt vor der Scheinbehandlung, rechts vier Wochen nach der Scheinbehandlung. Der Pseudarthrosespalt besteht unverändert.

Für die Stoßwellengruppe beispielhaft in **Abbildung 19**:

auf der linken Seite das Kaninchen 4351 direkt vor der ESWT, auf der rechten Seite vier Wochen nach der Behandlung. Hier kann man auch die beginnende Überbrückung im Pseudarthrosespalt erkennen, die vor der Behandlung nicht zu sehen war.

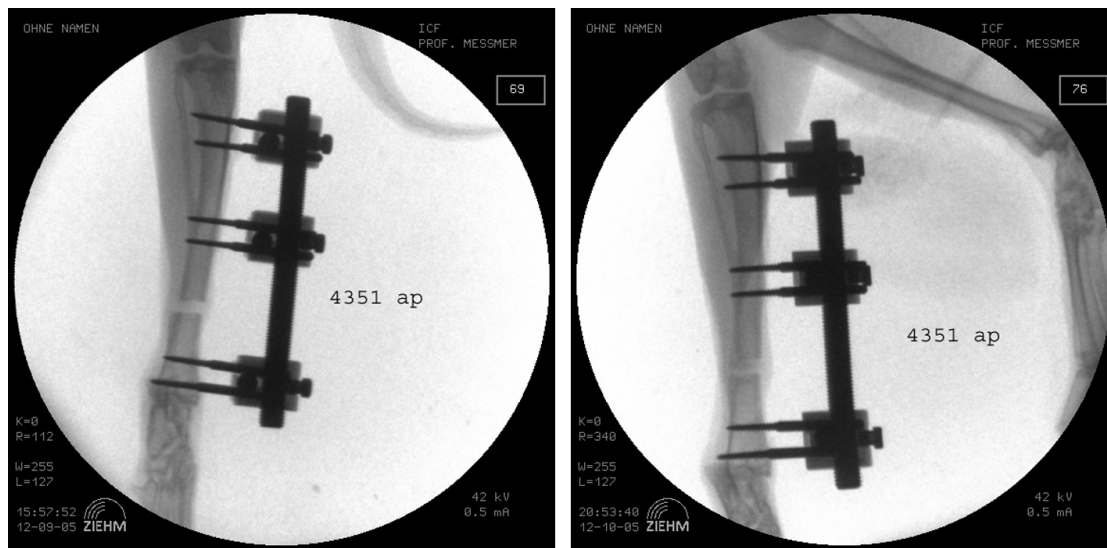


Abbildung 19:

Kaninchen 4351 aus der Versuchsgruppe. Links die Röntgenkontrolle direkt vor der Stoßwellenbehandlung, rechts vier Wochen danach. Man erkennt eine beginnende Kallusbildung über dem gesamten Pseudarthrosespalt.

4.2. Szintigraphie

4.2.1. Arterielle-Flow Messung

Die Messung der arteriellen Phase konnte nicht ausgewertet und somit auch keine Aussage über erhöhten/erniedrigten arteriellen Blutfluss getroffen werden. Grund waren zu niedrige Counts mit zu hoher Schwankungsbreite in der arteriellen Phase, da die i.v. Injektionsgeschwindigkeit des Radionukleoids nicht standardisierbar war, was am unterschiedlichen venösen Querschnitt lag.

4.2.2. Mischphase Messung

Für diese Phase konnte mit dem Wilcoxon-(Mann-Whitney)-Text für unverbundene Stichproben beim Vergleich der Quotienten aus Tag 28/Tag 0 beider Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden ($p=0,18$) (**Abbildung 20**).

Auch innerhalb beider Gruppen als verbundene Stichprobe war die Signifikanz weder vor Stoßwellenbehandlung noch 4 Wochen danach zu erhalten.

Bei der Verteilung sieht man innerhalb der Kontrollgruppe praktisch keine Veränderung vier Wochen nach Scheinbehandlung, in der ESWT-Gruppe jedoch tendenziell eine höhere Konzentration des ^{99m}Tc -DPD im Bereich der Pseudarthrose.

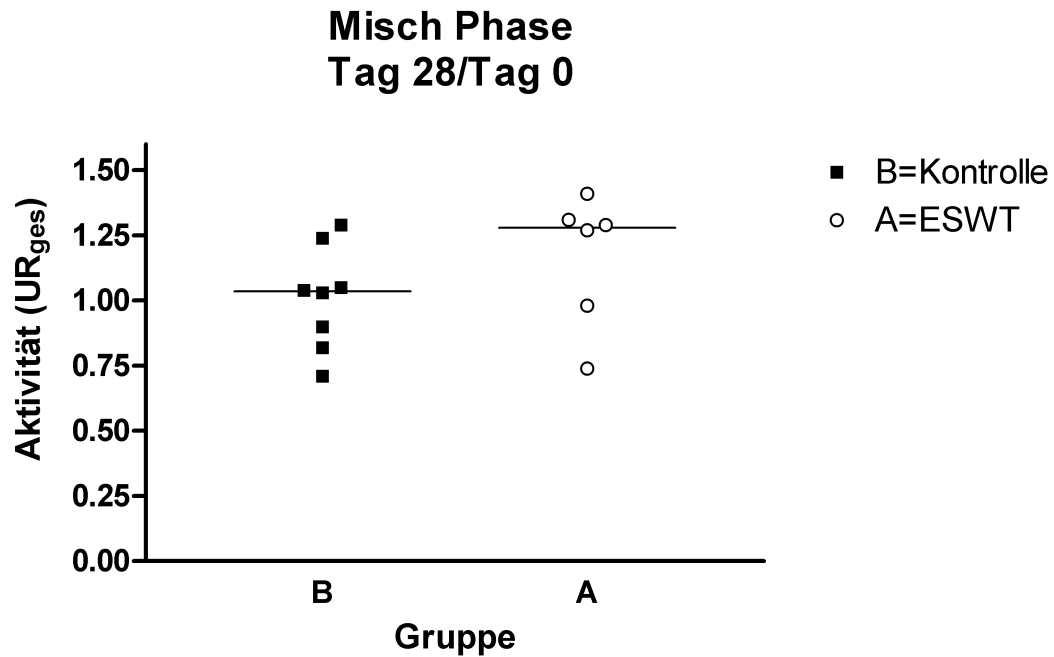


Abbildung 20:

Ergebnisse der Mischphase mit dem Verteilungsvolumen Gefäß, perivaskulärer Raum und beginnender Knochenstoffwechsel. Darstellung der Einzelwerte, die Mediane sind als Querstriche dargestellt. Der Unterschied im Wilcoxon-(Mann-Whitney)-Test war nicht signifikant ($p=0,18$). Die Werte vier Wochen nach ESWT und Scheinbehandlung wurden in der jeweiligen Gruppe durch die Werte direkt vorher geteilt.

4.2.3. Statische Phase

Abbildung 21 A zeigt beispielhaft die statische Aufnahme der Hinterläufe eines Tieres mit ^{99m}Tc -DPD Speicherung direkt **vor** einer Stoßwellenbehandlung (ESWT). Die Uptake Ratio betrug 2,753 (UR_1), was dem Verhältnis von gemessener Strahlung in ROI 1 (Seite der Pseudarthrose) zu ROI 2 entspricht somit und dort die Dosis der emittierten Strahlung vergleicht.

Abbildung 21 B zeigt beispielhaft die statische Aufnahme der Hinterläufe des selben Tieres mit ^{99m}Tc -DPD-Speicherung vier Wochen **nach** der vorangegangenen Stoßwellenbehandlung (ESWT) ($0,5\text{mJ/mm}^2$). Die Uptake Ratio betrug 3,645 (UR_2), was dem Verhältnis von gemessener Strahlung in ROI 1 zu ROI 2 entspricht.

Die errechnete UR_{ges} bezeichnet dabei die geänderten Aktivitätsverhältnisse von Tag 28 (vier Wochen nach ESWT) (UR_2), zu der Messung vor der ESWT (UR_1). In dem vorgelegten Beispiel entspricht also UR_{ges} einem Quotienten, der das Verhältnis von Tag 28 zu Tag 0 berechnet, das Ergebnis ist 1,32 (Faktor). In Worten ausgedrückt bedeutet dies, vier Wochen nach ESWT besteht auf der mit Stoßwelle behandelten Seite eine um 32 Prozent höhere Strahlenemission entsprechend einer höheren lokalen ^{99m}Tc -DPD-Aufnahme. Die Quotientenbildung ermöglicht auch bei unterschiedlicher Ausgangsaktivität den Vergleich aller Tiere.

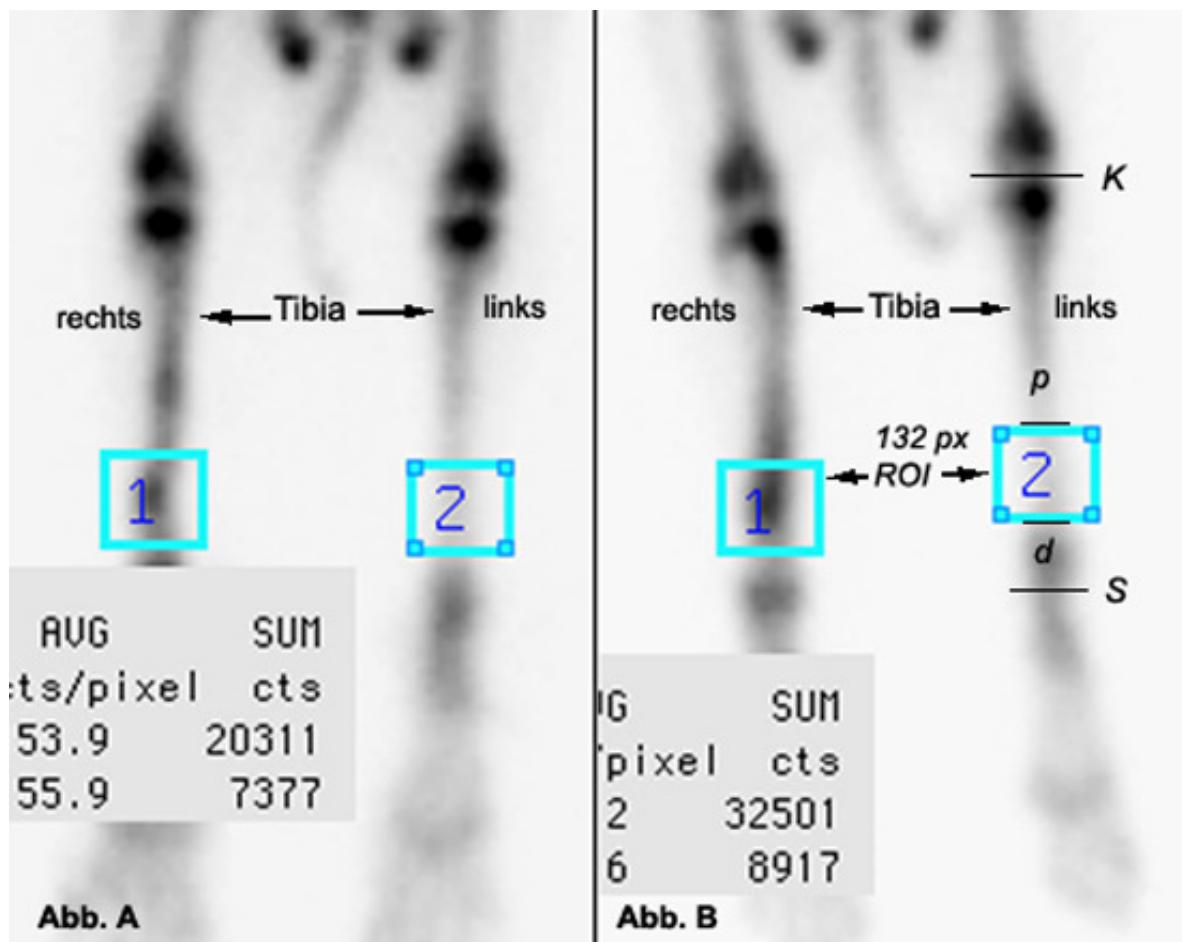


Abbildung 21:

A: Die statische ^{99m}Tc -DPD-Aufnahme zeigt die Hinterläufe eines Tieres vor der ESWT. An der rechten Tibia ist mit Nummer 1 die ROI mit 132 px (Pixel) Größe zentral auf die Pseudarthroseregion gelegt. ROI Nummer 2 entspricht derselben Position an der kontralateralen, gesunden Tibia.

B: Die statische ^{99m}Tc -DPD-Aufnahme zeigt die Hinterläufe desselben Tieres vier Wochen nach der ESWT. Wiederum wurden ROI Nummer 1 und 2 auf dieselbe Position gelegt.

Beispielhaft für jede ROI-Positionierung an der Tibia konnte für jedes Tier ein eigenes Verhältnis der Strecke p (Länge proximale Tibia) zu der Strecke d (Länge distale Tibia) auf der Röntgenaufnahme (mit abgrenzbarem Kniegelenksspalt, Pseudarthroseregion und oberem Sprunggelenk) gemessen werden. Das Verhältnis konnte so auf das Szintigramm übertragen werden, K steht für den Kniegelenksspalt und S für das Sprunggelenk.

Die **Abbildung 22** zeigt im Vergleich Gruppe A und B in der statischen Phase. Zu sehen ist jeweils der Quotient (UR_{ges}), der als solcher die relative Veränderung als Trend wiedergibt. Statistische Signifikanz wurde beim Vergleich beider Gruppen mit dem Wilcoxon-(Mann-Whitney)-Test ($p=0,012$) für unverbundene Stichproben gesehen. Bei Gruppe A ist ein Ausreißer zu sehen. Auch bei (nicht notwendiger) Wegnahme dieses Einzelwertes wäre die Signifikanz weiterhin gegeben ($p=0,029$). Mit Hilfe des Wilcoxon-signed-rank-Test für verbundene Stichproben konnte in der unbehandelten Gruppe B (Tag 28/Tag 0) keine statistische Signifikanz erreicht werden ($p=0,742$), aber in der behandelten Gruppe A (Tag 28/Tag 0) schon ($p=0,031$). Aus dem Quotienten Tag 28/Tag 0 ergibt sich in der Gruppe A eine Aktivitätszunahme um 30,1% , für Gruppe B um lediglich 0,8%.

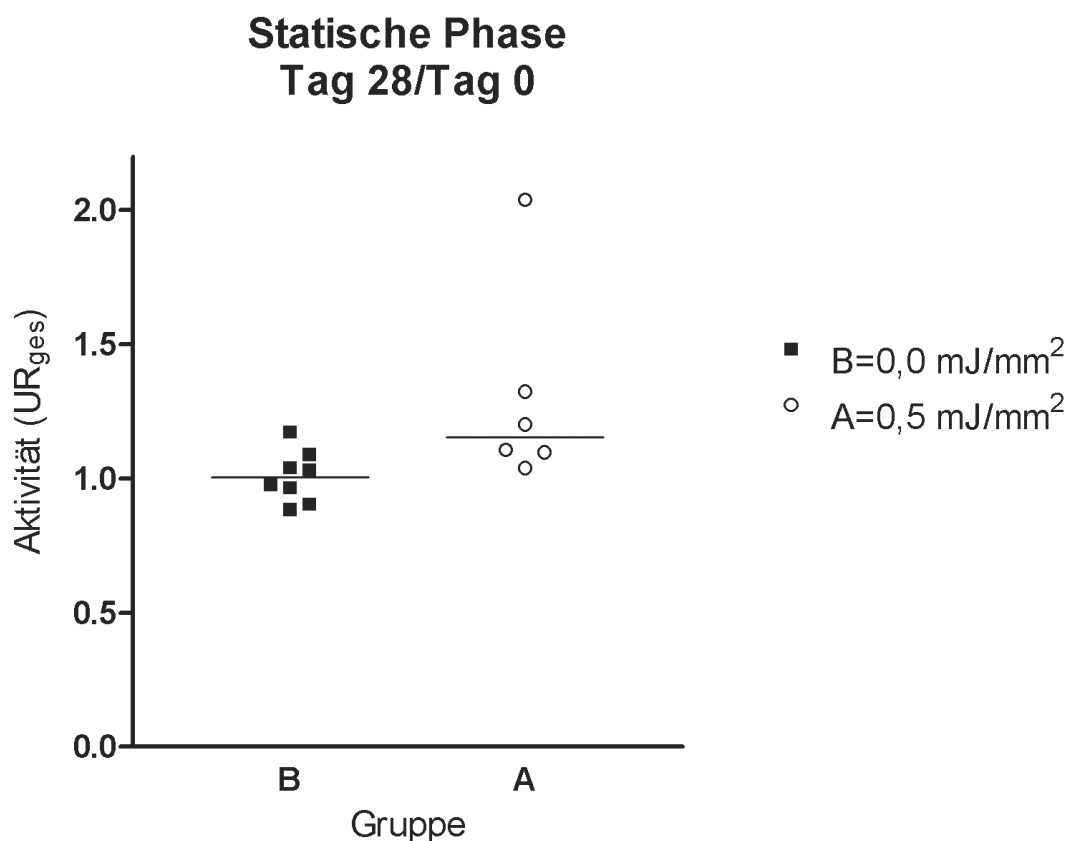


Abbildung 22:

Ergebnisse der statischen Aufnahmen der ^{99m}TC -DPD-Szintigraphie. Darstellung der Einzelwerte, die Mediane sind als Querstriche dargestellt. Der Unterschied beider Gruppen im Wilcoxon-(Mann-Whitney)-Test war signifikant ($p=0,012$). Gruppe B zeigt die Scheinbehandlung, Gruppe A die Behandlung mit 0,5mJ/mm².

Die **Abbildung 23** zeigt im Vergleich Gruppe A und B in der statischen Phase **vor** der Stoßwellenbehandlung (ESWT). Statistische Signifikanz wurde beim Vergleich beider Gruppen mit dem Wilcoxon-(Mann-Whitney)-Test ($p=0,662$) für unverbundene Stichproben nicht gefunden. Unter dieser Annahme gilt somit die Vergleichbarkeit der Gruppen.

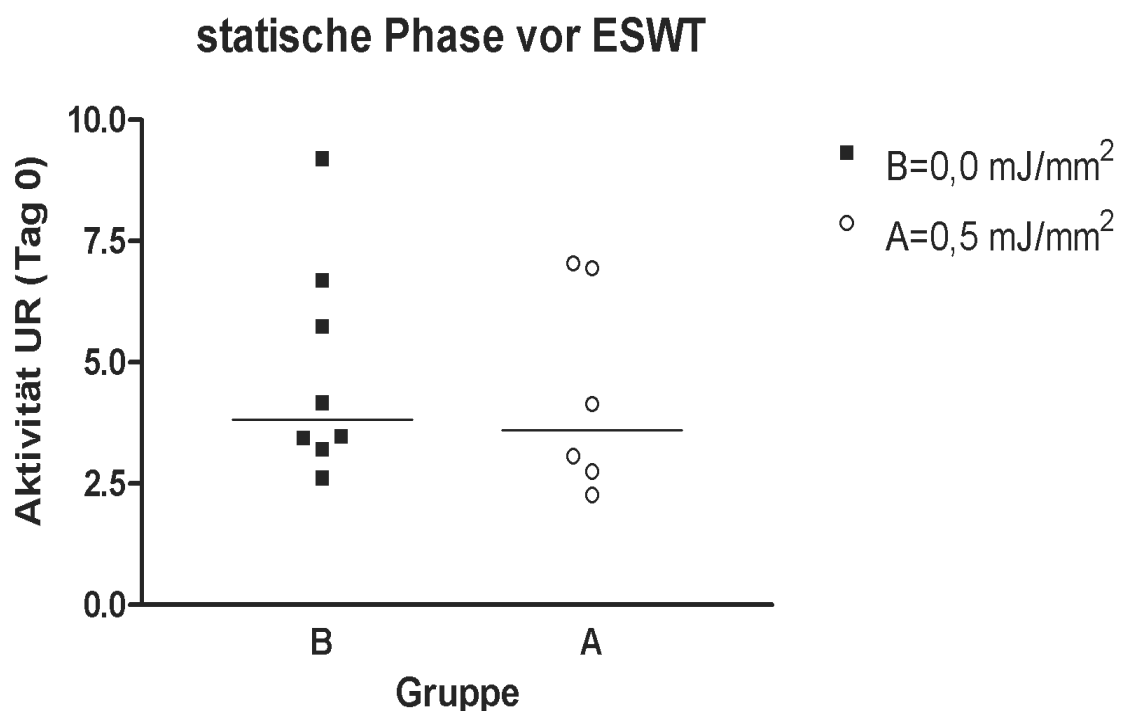


Abbildung 23: Ergebnisse der statischen Aufnahmen der ^{99m}Tc -DPD-Szintigraphie. Dargestellt werden beide Gruppen am Tag 0 noch vor der ESWT. Es konnte vor Behandlung kein signifikanter Unterschied dargestellt werden ($p=0,662$). Darstellung der Einzelwerte, der Median als Querstrich.

4.3. Serologische Untersuchung

Untersucht wurden verschiedene Serum-Parameter die direkt oder indirekt am Knochenstoffwechsel beteiligt sind (siehe Methodik, Kap. 3.2.4.).

4.3.1. Osteocalcin

Abbildung 24 zeigt den Verlauf von Tag 0 bis Tag 28, wobei jeweils der Median angegeben ist. Statistische Signifikanz konnte bei Vergleich einzelner Tage nicht festgestellt werden. Bei dem Summenvergleich beider Gruppen über alle Tage hinweg lässt sich jedoch ein signifikanter Unterschied nachweisen (R, Statistiksoftware, AT&T Bell Laboratories, ISBN 3-900051-12-7). Nach einem kurzen Abfall am ersten Tag in beiden Gruppen sieht man nach einer Latenz von ca. 14 Tagen sekundär einen leichten Anstieg in der ESWT-Gruppe.

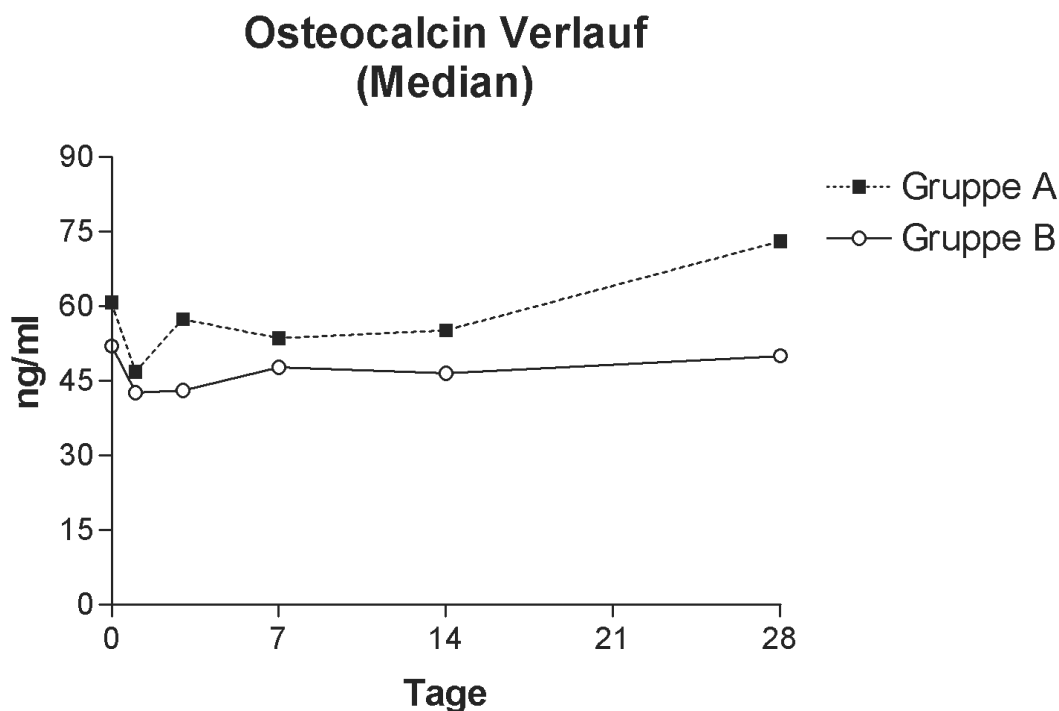


Abbildung 24: Gruppe A = ESWT, Gruppe B = Kontrolle

4.3.2. bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)

Abbildung 25 zeigt den Verlauf von Tag 0 bis Tag 28, wobei jeweils nur der Median angegeben ist. Statistische Signifikanz konnte bei Vergleich einzelner Tage nicht festgestellt werden. Die Serumkonzentration der behandelten Tiere steigt zwischenzeitlich nur gering an, um dann an Tag 28 in etwa auf ihr Ausgangsniveau zu fallen. Bei der unbehandelten Gruppe sieht man eine gegenteilige Entwicklung, hier zeigt sich ein Abfall nach der Scheinbehandlung und im Verlauf ein Wiederlangen der ursprünglichen Konzentration.

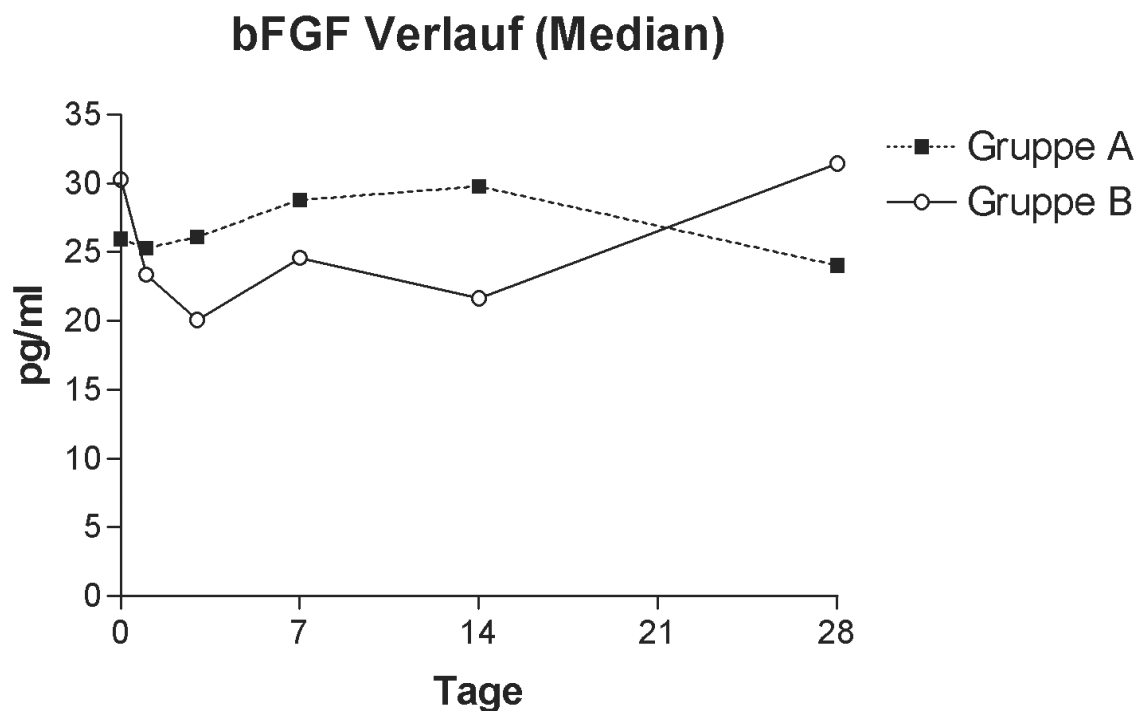


Abbildung 25:
Gruppe A = ESWT, Gruppe B = Kontrolle

4.3.3. TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1)

Abbildung 26 zeigt den Verlauf von Tag 0 bis Tag 28, wobei jeweils nur der Median angegeben ist. Statistische Signifikanz konnte bei Vergleich einzelner Tage nicht festgestellt werden. Ergänzend muss erwähnt werden, dass hierbei **nur** jeweils drei bis vier verlässliche Messwerte pro Gruppe einfließen konnten (Fehlmessungen), weshalb hier auch die Aussage von statistischen Tests kaum gelten kann und der Serumspiegel im Verlauf höchstens eine Annäherung bietet. Es zeigt sich ein uneinheitliches Bild ohne klare Tendenz mit einer primären Konzentrationsabnahme in beiden Gruppen. Am Tag 28 sieht man ein leichtes Abfallen der Konzentration in der scheinbehandelten Gruppe.

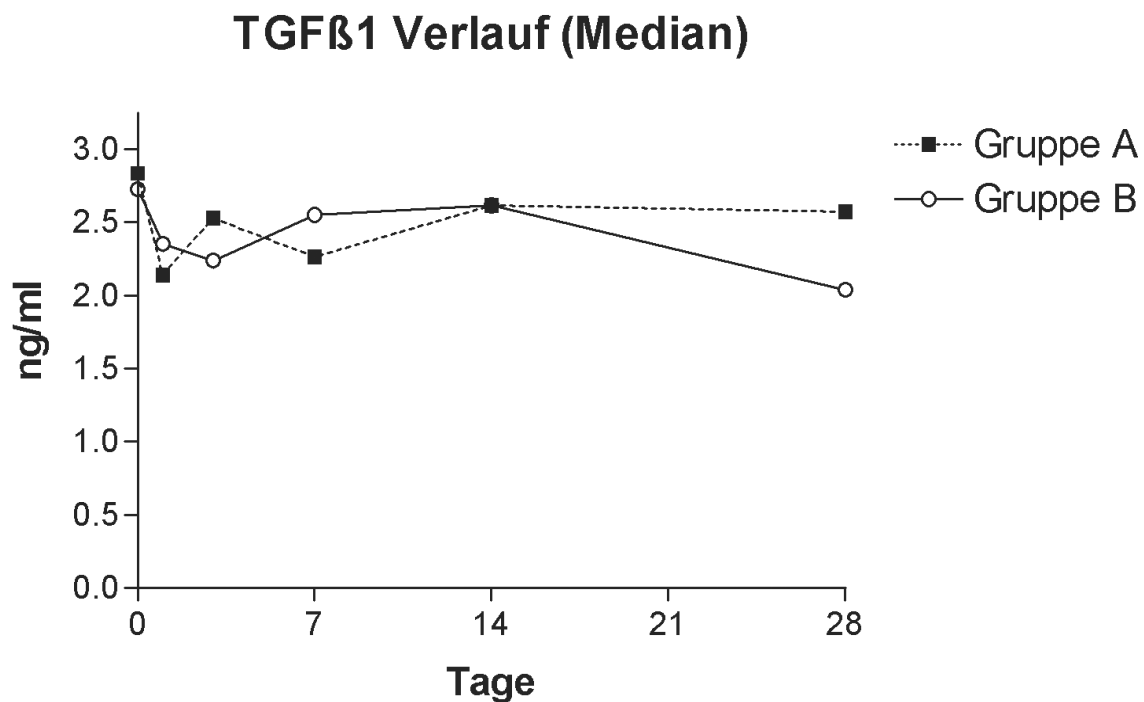


Abbildung 26:
Gruppe A = ESWT, Gruppe B = Kontrolle

4.3.4. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Abbildung 27 zeigt den Verlauf von Tag 0 bis Tag 28, wobei jeweils nur der Median angegeben ist. Statistische Signifikanz konnte bei Vergleich einzelner Tage nicht festgestellt werden. Ergänzend muss erwähnt werden, dass hierbei **nur** jeweils drei bis vier verlässliche Messwerte pro Gruppe einfließen konnten (Fehlmessungen), weshalb hier auch die Aussage von statistischen Tests kaum gelten kann und der Serumspiegel im Verlauf höchstens eine Annäherung bietet. Nach einer geringen Abnahme in der Versuchsgruppe sieht man, dass die Serumkonzentration mit einem Maximum um den 7ten bis 14ten Tag steil ansteigt und sich in etwa verdreifacht, um dann mit einem späten Abfall auf das Ausgangsniveau zu sinken. In der scheinbehandelten Gruppe sieht man ein uneinheitliches Bild mit einem kleinen Ausreißer am Tag 7 sowie einer grundsätzlich leicht steigenden Tendenz.

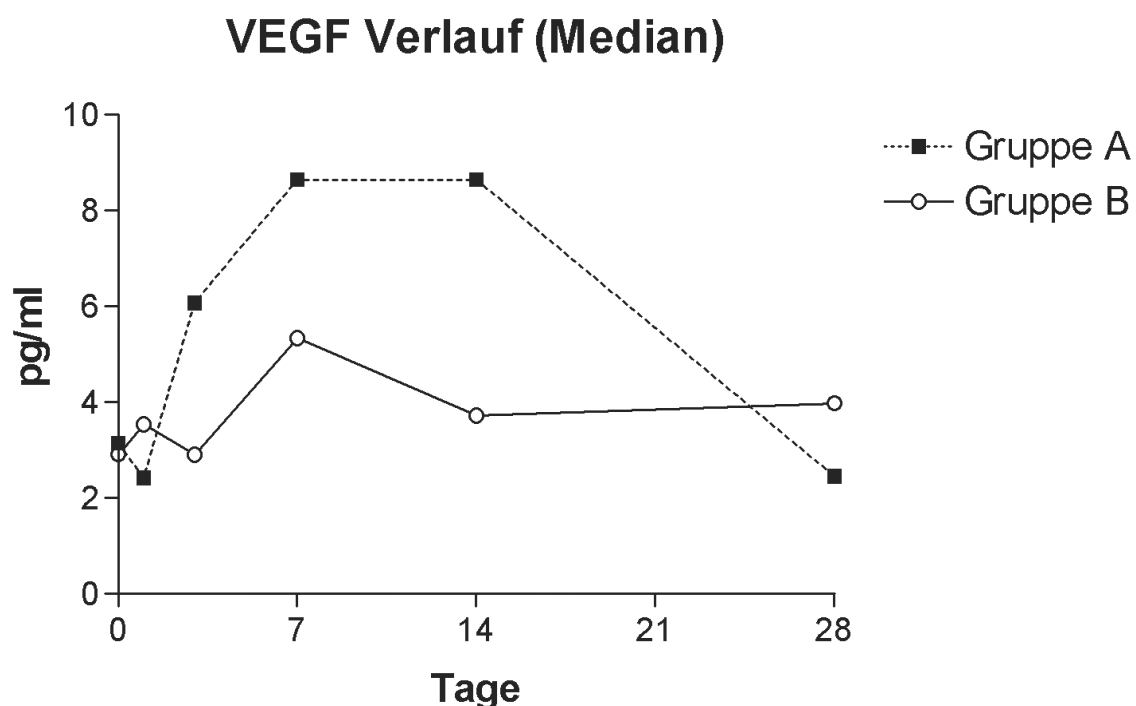


Abbildung 27:
Gruppe A = ESWT, Gruppe B = Kontrolle

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Stoßwellenbehandlung der atrophen Pseudarthrose an der distalen Tibia des Kaninchens mit einer Energieflussdichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$

- **induziert in der Versuchsgruppe eine ungleich höhere röntgenologische Durchbauungsrate einen Monat nach ESWT im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ESWT**
- **führt zu einem signifikanten Unterschied der Osteocalcin-Konzentration im Serum über die gesamte Dauer der Messung.**
- **führt in der Versuchsgruppe zu einer signifikanten Zunahme des Knochenstoffwechsels im Bereich der atrophen Pseudarthrose verglichen mit der Kontrollgruppe.**

Für den Serummarker bFGF konnte keine Signifikanz bei dem Vergleich beider Gruppen bzw. innerhalb einer Gruppe errechnet werden. Für das VEGF konnte aufgrund der wenigen gültigen Messwerte keine statistische Auswertung vorgenommen werden, gleiches gilt für das TGF- β 1. Bei VEGF war in der Versuchsgruppe eine Tendenz auszumachen im Sinne eines Anstiegs von Tag 3 bis Tag 14.

5. Diskussion

Gemäß den vorliegenden Ergebnissen konnten alle in der Einleitung formulierten Hypothesen bestätigt werden, bis auf eine. Die folgenden Ergebnisse werden im Anschluss bezüglich der verwendeten Methodik hinterfragt und im Rahmen artverwandter, relevanter Arbeiten auf ihre Aussagekraft hin untersucht.

Die Behandlung der atrophen Pseudarthrose durch Stoßwellentherapie am standardisierten Kaninchenmodell

- induziert eine höhere Heilungsrate als der Spontanverlauf.
- führt bei gegebener Fallzahl nicht zu einem signifikanten Anstieg der untersuchten Wachstumsfaktoren, auch wenn man eine Tendenz wie im Fall des VEGF und des Osteocalcins sieht.
- zeigt eine signifikante Steigerung in der statischen Phase des Knochenstoffwechsels vier Wochen nach Stoßwellenapplikation.

5.1. Validität der Methoden – Behandlung

5.1.1. Wahl der Stoßwellenparameter

Die in-vivo-Applikation von Stoßwellen am Kaninchenknochen (New Zealand White) ist ein etabliertes Verfahren (Bulut et al., 2006; Delius et al., 1995; Graff, 1989; Hausdorf et al., 2004; Hsu et al., 2004; Maier et al., 2002a; Maier et al., 2003; Tischer et al., 2002; Van Arsdalen et al., 1991; Wang et al., 2005).

Die Stoßwellenanzahl (2 mal 750) und Energieflußdichte ($0,5 \text{ mJ/mm}^2$) wurden in der Versuchsgruppe festgelegt, da aus unserer Sicht bei dem verwendeten Gerät somit das

wirkungsvollste Ergebnis bei gleichzeitig klinisch vertretbaren Nebenwirkungen erreichbar schien (Maier et al., 2002a). Es gibt bisher kein anderes standardisiertes Schema, welches nach den Vorgaben einer randomisierten und geblindeten Studie arbeitet und ähnliche Ergebnisse liefern konnte.

5.1.2. Stoßwellenaufbau

Wie anfangs in Kapitel 2.1.2. erläutert, sind verschiedene Arten der Stoßwellengenerierung und unterschiedliche Geräte auf dem Markt. Es gibt selbst bei gleichen Energieflußdichten einen Unterschied im Aufbau der Stoßwelle bezüglich Geschwindigkeit des Druckaufbaus und der für die Kavitation verantwortlichen Zugwelle. Ob diese Abweichungen einen Einfluß auf das Gewebe haben ist unklar. Auch aus diesem Grund basiert der Versuch vor allem auf den Beobachtungen von Arbeiten an demselben Gerät (Delius et al., 1995; Hausdorf et al., 2004; Maier et al., 2002a; Tischer et al., 2002). Genaue und allgemeingültige Vorgaben hierfür wären wünschenswert.

5.2. Validität der Methoden – Untersuchung

Die Untersuchungen der Tiere zur Erfassung von stoßwellenvermittelten Effekten erfolgten unter Verwendung etablierter Methoden. Diese werden im Einzelnen in den folgenden Absätzen erörtert.

5.2.1. Röntgenologische Beurteilung

Die Radiologie, in dieser Arbeit die Durchleuchtung mit einem digitalen Bildwandler, erlaubt die Beurteilung der Knochenintegrität. Bei der sekundären Knochenbruchheilung, wie in

unserem Fall bei der Pseudarthrose, kann der sich am Beginn der Kalzifikation befindliche Kallus bezüglich seiner Homogenität, Größe und Kontinuität zwischen den beteiligten Knochenenden beurteilt werden. Dieses Verfahren ist dadurch optimal geeignet, den Fortschritt der Heilung zu beobachten. Aussagen hinsichtlich mechanischer Stabilität sind nicht möglich.

5.2.2. Szintigraphie zur Messung des Knochenstoffwechsels

Klinisch ist diese Methode etabliert, um quantitativ Veränderungen im lokalen Blutfluss (arterieller und venöser Flow) und Veränderungen des Knochenstoffwechsels (statische Phase) zu erfassen (Hain et al., 2002;Hendler and Hershkop, 1998;Pauwels and Stokkel, 2001). Sie ist durch den vergleichsweise geringen Eingriff am Patienten und die kurze Halbwertszeit des Technetiums eine risikoarme Methode. Die Genauigkeit der Messung bei korrekter Anwendung stellt zudem einen verlässlichen Parameter dar. Die im Tierexperiment gewonnenen Daten lassen sich deshalb gut in die klinische Anwendung übertragen. Nicht beurteilbar ist die arterielle Phase, da stark unterschiedliche Injektionsgeschwindigkeiten aufgrund des unterschiedlichen Venendurchmessers in Kauf genommen werden mussten (Wallace et al., 1992).

5.2.3. Szintigraphie mit ^{99m}Tc -DPD versus ^{99m}Tc -MDP

Viele Studien zur Messung des Knochenstoffwechsels beim Kaninchen und im Besonderen bei der Pseudarthrose arbeiten mit ^{99m}Tc -MDP (Gunalp et al., 1992;Sonne-Holm et al., 1987;Volpon, 1994;Wallace et al., 1992). Nur zwei Arbeiten am gesunden Kaninchenknochen und die vorliegende Arbeit verwenden ^{99m}Tc -DPD (Gunalp et al., 1992;Maier et al., 2002a). Die bisherige Forschung lässt keine dezidierte Bevorzugung eines bestimmten Markers zu. Aus unserer Sicht sind somit beide Marker bei der Fragestellung optimal geeignet (Buell et al., 1982;Schroth et al., 1984;Schuemichen et al., 1988;Subramanian et al., 1983;Vorne et al., 1983).

5.2.4. Knochenwachstumsmarker Messungen

Mit der Untersuchung von VEGF, TGF- β 1, bFGF und Osteocalcin im Serum kann in der Zusammenschau eine indirekte Aussage über den lokalen Knochenmetabolismus (Ferrara, 2004;Kanaan and Kanaan, 2006;Wang, 1996;Weiss et al., 2002;Weiss et al., 2005) gemacht werden. Ein Abbild des Heilungszustandes lässt sich auch durch Beurteilung verschiedener Marker bisher nicht erarbeiten. Bei artverwandten Versuchen konnte aber ein ähnlicher Verlauf der gemessenen Marker im Tiermodell und beim Menschen gesehen werden (Seebeck et al., 2005;Solheim, 1998;Weiss et al., 2002). Eine gleichzeitige immunhistologische und systemische Untersuchung zu mehreren Zeitpunkten ist nach jetzigem Kenntnisstand nicht vorhanden, könnte aber möglicherweise Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse der systemischen Messung bringen.

5.3. Ergebnisdiskussion

Einleitung:

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Applikation extrakorporaler Stoßwellen auf die atrophe Pseudarthrose der Tibia am Kaninchen im Vergleich zur scheinbehandelten Gruppe eine knöcherne Durchbauung möglich macht oder zumindest deutlich beschleunigt (**Abbildung 17**). Dieses Ergebnis bestätigt auch die Überlegung von Maier (Maier et al., 2002a), dass eine Induktion der Knochenheilung ohne Mikrofrakturierung möglich sein müsste.

Dies ist von klarer klinischer Relevanz. Unter in-vivo-Modell-Bedingungen wurde die Behandlung einer beim Menschen sehr häufigen Pseudarthrose mit Lokalisation am Tibiaschaft mit knapp 19% Anteil (Runkel and Rommens, 2000) beim Kaninchen untersucht. Ob Tiere, die erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt mittels Stoßwelle behandelt worden wären (> acht Wochen post Osteotomie), ähnlich schnell eine Durchbauung gezeigt hätten, ist nicht zu beantworten (Biedermann et al., 2003).

Aktuell finden sich in der internationalen peer-reviewed Literatur (26.08.2008) 28 Arbeiten, die sich mit der Stoßwellenwirkung auf den Knochen am Tiermodell befassen (Tabelle 3, siehe Anhang). Auf den pathologisch veränderten Knochen eingeschränkt, sind es noch elf Veröffentlichungen.

Für die Stoßwellenwirkung auf die Pseudarthrose finden sich nur zwei Arbeiten, aber bezogen auf ein standardisiertes Modell zur atrophen Pseudarthrose ist keine Arbeit vorhanden.

Die 15 (siehe Tabelle 4 im Anhang) vorhandenen klinischen Studien sind (bezogen auf die wenigen Daten zur atrophen Pseudarthrose) bezüglich des Alters der Pseudarthrose bei Behandlung, der Vorbehandlungen, der Nachbeobachtungszeit, der Lokalisation, der systemischen Vorerkrankungen, der verwendeten Energieflussdichte des Stoßwellen-Generator-Typs und der Ergebnisse äußerst inhomogen und eine Vergleichbarkeit ist so nicht möglich. So zeigen sich in einigen klinischen Studien zur Pseudarthrose fulminante Ergebnisse mit hohen Heilungsraten von 75% bis 91% (Haist et al., 1993;Schleberger, 1995;Schleberger and Senge, 1992;Valchanou and Michailov, 1991), auf der anderen Seite Studien mit Heilungsraten von 41% bis 52% (Beutler et al., 1999;Rompe, 1997).

Das hier verwendete Modell der atrophen Pseudarthrose an der distalen Tibia ist in der Literatur etabliert (Brownlow et al., 2001;Brownlow and Simpson, 2000;Eckardt et al., 2005).

Es ermöglicht, die Wirkung der fokussierten Stoßwellenbehandlung auf die lokalen Knochenstoffwechselvorgänge – im Vergleich mit einer scheinbehandelten Kontrollgruppe – anhand anerkannter Methoden zu untersuchen.

Es stellt sich die Frage, inwieweit dieses Modell der gängigen Vorstellung einer atrophen Pseudarthrose – entsprechend der gültigen Definition (siehe Absatz 2.2.) – beim Menschen entspricht? Ist die atrophe Pseudarthrose, per Definition acht Wochen nach Tibia-Osteotomie an ausgewachsenen Kaninchen, vergleichbar mit der gängigen Definition der atrophen Pseudarthrose nach sechs Monaten beim Menschen?

Wie in Absatz 2.2.2. zur atrophen Pseudarthrose beschrieben, definiert sich diese klinisch und

über das röntgenologische Erscheinungsbild. Histologische und mikroradiographische Kriterien sind meist nur im Experiment weiter zu untersuchen, womit sich die zwei folgenden Studien befassen.

Die eingangs erläuterten Kriterien der atrophen Pseudarthrose (Brownlow et al., 2001; Brownlow and Simpson, 2000) konnten histologisch, definitionsgemäß zum Zeitpunkt von acht Wochen nach Osteotomie, beobachtet werden. Beschrieben ist das Vorhandensein von fibrösem Gewebe ohne Knorpelanteil oder Hinweis auf Kallusbildung im Pseudarthrosespalt. Ferner sieht man kleine Knochenanbauten am Endost, aber nicht über die Osteotomielinie reichend, und dort auch Zeichen einer bereits begonnenen Knochenresorption.

Auch in einer weiteren Studie an Ratten versuchte man anhand einer Femur-Osteotomie (3 mm Spalt) eine atrophe Pseudarthrose zu standardisieren. Hier setzte man den Zeitpunkt auf neun Wochen nach Osteotomie (Harrison et al., 2003). Nach 9 Wochen wurde die Mineralisierung im Osteotomiespalt mittels Dual-Energy-X-Ray (DEXA) gemessen, das Gewebe histologisch aufgearbeitet und mechanische Tests durchgeführt. Im Ergebnis kamen die Autoren zu dem Schluss, dass es sich um ein standardisiertes Modell der atrophen Pseudarthrose handelt.

In anderen Arbeiten mit ähnlich kurzen Nachbeobachtungszeiträumen findet sich bei vergleichbarer operativer Vorgehensweise mit Devastierung der Knochenenden und einem entsprechenden Osteotomie-Spalt röntgenologisch eine bewusst induzierte hypertrophe oder atrophe Pseudarthrose.

Eine Studie (Johannes et al., 1994) zur Stoßwellenbehandlung der hypertrophen Pseudarthrose am Radius von Hunden wählte den Zeitpunkt von zwölf Wochen nach Osteotomie. In der nicht mit Stoßwellen behandelten Gruppe zeigten nach weiteren zwölf Wochen (also insgesamt 24 Wochen) vier von fünf Tieren keine knöcherne Überbrückung. Auch hier entsprachen, abgesehen von der Lokalisation (Radius), die Spaltgröße und Art der Devastierung unserem Modell, bei indirekter Schienung durch die Ulna.

Bulut (Bulut et al., 2006) postulierte eine atrophe Pseudarthrose durch Radiusosteotomie am Kaninchen 50 Tage nach Osteotomie. Allerdings kam hier für 40 Tage ein Polyethylen Interponat als Platzhalter zum Einsatz. Zehn Tage nach Entfernung des Polyethylens folgte dann anhand eines Röntgenbildes die Beurteilung. Kritisch ist anzumerken, dass die Tiere nicht ausgewachsen waren (offene Epiphysenfuge) und das Interponat im Spalt operativ entfernt werden musste, was

die Möglichkeit eines Spalthämatomes mit osteogener Potenz bietet und schon zehn Tage danach eine mögliche Kallusbildung röntgenologisch gar nicht beurteilt werden kann.

5.3.1. Wirkung auf den Knochenstoffwechsel – Szintigraphie Befund

Gängige bildgebende Verfahren der täglichen Praxis ermöglichen ein morphologisches Abbild der Pseudarthrose. Aussagen über den Funktionszustand lokaler Stoffwechselvorgänge und der Durchblutungssituation an einer atrophen Pseudarthrose sind funktionell in vivo nur durch die Knochenszintigraphie möglich.

Die Messungen der Knochenszintigraphie zum Zeitpunkt acht Wochen nach Osteotomie zeigen in der vorliegenden Arbeit durchgehend einen erhöhten Knochenstoffwechsel an der atrophen Pseudarthroseregion im Vergleich zur gesunden Tibia. Dies spricht aber nicht gegen eine atrophe Pseudarthrose, wie im Folgenden erläutert wird.

Volpon hat in der Knochenszintigraphie mit ^{99m}Tc -MDP noch sechs Monate nach Osteotomie fast doppelt so hohe Werte im Vergleich zur gesunden Seite gemessen (Volpon, 1994). In seinem Modell am Radius von Hunden (5 mm Spalt, 2 cm Periostabtragung beidseits) wies er später auch histologisch die atrophe Pseudarthrose nach. Bei der atrophen Pseudarthrose kommt es häufig röntgenologisch zu einer fortschreitenden Abrundung (Abbau) der Knochenenden, was die Vitalität des Gewebes zeigt.

Auch spielt der eingebrachte Fixateur externe eine Rolle bei der Erhöhung des tibialen Gesamtknochenstoffwechsels.

Wallace untersuchte 49 Patienten nach einer Tibia-Schaft-Fraktur unterschiedlicher Ursache, wovon elf mit einem Gips, 16 mit einem Fixateur externe und 22 mit einem Marknagel versorgt wurden (Wallace et al., 1992). Es wurde eine Phase des venösen Poolings und beginnenden Knochenstoffwechsels gewählt, die Messung fand 300 Sekunden bis 800 Sekunden nach Injektion von ^{99m}Tc -MDP statt. Verglichen wurde die ROI an der Fraktur mit der kontralateralen gesunden ROI. Nur in der mit einem Gips versorgten Gruppe wurde eine Tendenz von Aktivitätsunterschied und Heilungsgeschwindigkeit gesehen. Und lediglich die mit einem

Fixateur externe versorgte Gruppe zeigte im Vergleich zu den anderen Gruppen eine signifikant höhere Traceraufnahme an der Frakturstelle, vermutlich durch Stoffwechselzunahme im gesamten Knochen.

Gunalp untersuchte szintigraphisch bei 45 Patienten mit Pseudarthrose im Bereich Humerus, Femur, Tibia und Radius durchschnittlich acht Monate nach Trauma den Erfolg einer elektromagnetischen Stimulation (Gunalp et al., 1992). Danach scheint die Gruppe mit einer flächigen Traceranreicherung gut auf die Therapie anzusprechen, die Gruppe mit inhomogener und teils verminderter Traceranreicherung nicht. Eine statistische Auswertung fand aber nicht statt, auch ist nicht beschrieben, welche Behandlungen die Patienten initial nach dem Trauma erhielten.

Die bisherigen Studien zeigen die Schwierigkeit der Wahl eines geeigneten Messzeitpunktes. Am gesunden Kaninchenknochen gibt es nur eine Studie, die sich mit dem Knochenstoffwechsel und der Durchblutung nach Stoßwellenapplikation beschäftigt (Maier et al., 2002a). Zehn Tage nach ESWT waren sowohl Knochenstoffwechsel als auch Durchblutung in den Gruppen mit 0,5 und 0,9 mJ/mm² vermindert, nach 28 Tagen in der Gruppe mit 0,9 mJ/mm² (einzige Spätmessung) erhöht.

Eine vergleichende Untersuchung der röntgenologischen Beobachtungen mit erhöhter Durchbauung des Osteotomiespaltes in der Stoßwellengruppe und der szintigraphischen Änderungen konnte nicht durchgeführt werden, da die Auflösung der Gamma-Kamera nicht ausreicht.

5.3.2. Systemische Messung lokaler Stoffwechselvorgänge im Serum

Ein Ziel der Arbeit war es, für den klinischen Einsatz bereits in Erprobung befindliche Marker (Weiss et al., 2002), die in Zusammenhang mit der lokalen Knochenheilung stehen, bezüglich ihrer Konzentration im Serum abzubilden. Dies spiegelt auch die Überlegung von Wang wider, der durch einmaligen mechanischen Reiz die langfristige Initiation von Enzymkaskaden sieht (Wang et al., 2001c).

Southwood (Southwood et al., 2003) hat bei deutlicher Kallusbildung ohne Heilungstendenz die Beobachtung gemacht, dass **Osteocalcin** in höheren Konzentrationen acht Wochen nach Osteotomie (10 mm Defekt, insgesamt 20 Kaninchen, kein weiterer mechanischer Reiz) im Serum auftritt. Ziel der Studie war, einen Heilungsverlauf anhand der Serumkonzentration von Knochenwachstumsmarkern zu prognostizieren, was nicht gelang.

Seebeck et al. (2005) untersuchten Osteocalcin-Serum-Spiegel bei normaler Frakturheilung am Schaf mit 3 mm Frakturspalt und Fixateur externe. Signifikante Unterschiede im Verlauf konnten hier auch nicht gezeigt werden, einzig, dass am Tag 2 nach Osteotomie ein leichter Abfall des Serum-Osteocalcins zu verzeichnen war. Interessanterweise konnte Ähnliches in der vorliegenden Arbeit am ersten Tag post ESWT beobachtet werden, allerdings bleibt unklar, warum die Kontrollgruppe auch einen geringen Abfall zeigt.

Bei den Untersuchungen von Stoffel (Stoffel et al., 2007) wurden 20 Patienten und der Verlauf des Serum-Osteocalcins direkt nach Fraktur beobachtet, wobei initial schon ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen war, der nach etwa 20 Tagen nur noch gering zunahm. Möglicherweise ist der in der vorliegenden Arbeit direkt zu prä-ESWT nur gering veränderte Osteocalcin-Spiegel der Tatsache geschuldet, dass durch Umbauvorgänge die initialen Konzentrationen bereits im Vergleich zum gesunden Kaninchen erhöht waren. Anfangswerte liegen nicht vor.

Wang (Wang et al., 2003) untersuchte histomorphologisch die Konzentration von **VEGF** über zwölf Wochen an je zehn New-Zealand-White-Kaninchen nach lokaler Behandlung mit fokussierten Stoßwellen auf die Knochen-Sehnenapophyse der Achillessehne. Zwischen der ersten und achten Woche nach Behandlung konnte er so einen signifikanten lokalen Anstieg von VEGF gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen, was auch mit einem signifikanten Anstieg von Gefäßneubildungen (histologisch untersucht) zwischen der vierten und zwölften Woche einherging. Dies entspricht hier den Beobachtungen eines deutlichen Anstieges von VEGF systemisch etwa eine Woche nach ESWT im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Rolle bei der Defekt- und Frakturheilung von VEGF untersuchten Street et al. 2002 am Maus- und New-Zealand-White-Kaninchen-Modell mit je mindestens sieben Versuchstieren pro Gruppe. Dazu wurden 1,2 cm lange Defekte im Radius des Kaninchens, Bohrlöcher am Tibiaschaft und fixierte Frakturen der Tibiadiaphyse der Maus erzeugt. Jeweils eine

Kontrollgruppe, eine Gruppe mit Anti VEGF-IgG (Flt-IgG) und eine Gruppe mit Gabe von rekombinantem VEGF wurden nach sieben und 14 Tagen mittels 3D-CT-Rekonstruktionen sowie immunhistochemischen Methoden untersucht. Zwischen der Gruppe mit zusätzlicher VEGF-Gabe und dem VEGF-Inhibitor (Flt-IgG) konnte ein signifikanter Unterschied in der Kallusbildung und Mineralisation gezeigt werden.

Eine Arbeitsgruppe um Maes (Maes et al., 2002) beobachtete bei noch im Wachstum befindlichen Mäusen mit genetisch deletierten VEGF-Isoformen 164 und 188, dass sowohl Volumen als auch Kalzifikation im Vergleich mit der Wildtyp-Maus deutlich geringer ausfielen. Auch immunhistochemisch wurde anhand des Verteilungsmusters von Kollagen X im Rahmen der Chondrozytenreifung ein Vorsprung der Wildtyp-Maus bei der Chondrozytenreifung gezeigt. Ein in-vitro-Versuch mit Stoßwellen (OssaTron, $0,16 \text{ mJ/mm}^2$, 500 Impulse) an humanen prä-Osteoblasten konnte nach zwölf Stunden einen signifikanten Anstieg der mRNA von VEGF-A nachweisen (Wang et al., 2004). Die Gruppe kam zu dem Schluss, dass der VEGF-A Anstieg bereits nach zwölf Stunden durch eine stoßwellenvermittelte Aktivierung der ras- und erk-Kaskade verursacht wird, die ebenfalls gemessen wurde. Der signifikant erhöhte 24-Stunden-Wert konnte in der vorliegenden Arbeit systemisch nicht gesehen werden.

Mit denselben Vorgaben (OssaTron, $0,16 \text{ mJ/mm}^2$, 500 Impulse) unternahm Chen (Chen et al., 2004) einen in-vivo-Versuch an Ratten. Ein segmentaler Defekt am Femur von 5 mm Länge wurde durch eine Plattenosteosynthese stabilisiert, zwölf Wochen danach die Defektzone mit der erwähnten Stoßwellen-Konfiguration behandelt. Nach 3, 7, 14 und 28 Tagen wurden je acht Tiere in einer Versuchs- und Kontrollgruppe eingeschläfert und bezüglich Expression von VEGF-A und TGF- β 1 sowie (RP59 positiven) Knochenmark-Stammzellen und frühen Osteoblasten untersucht. TGF- β 1 war zu allen Zeitpunkten post-ESWT im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, VEGF-A erst ab Tag 14. Untersuchungen wurden auch bezüglich der Zellzusammensetzung gemacht, wobei jeweils signifikant mehr Zellen post-ESWT und auch signifikant mehr RP59-positive Zellen in der Versuchsgruppe nachzuweisen waren. Möglicherweise ist dieser spätere Anstieg durch die geringere Energieflussdichte und Impulszahl erklärbar.

Eine weitere in-vitro-Studie untersucht die Stoßwellenwirkung [OssaTron, 0,16 mJ/mm², 500 Impulse, (250 - 3000 Impulse)] auf humane Knochenmark-Stammzellen und die Expression von **TGF-β1** (Wang et al., 2001c). Nach einer Behandlung mit 500 Impulsen zeigte die Versuchsgruppe im Zeitraum von 24 – 72 Stunden post-ESWT einen signifikanten Anstieg der TGF-β1-Konzentration. Da Daten zur Diffusion/Sekretion von lokal zu systemisch nicht vorliegen, kann eine Wertung in Bezug auf die vorliegende Arbeit nicht unternommen werden. Nach einer weiteren Studie (Brownlow et al., 2001) ist in einem dem vorliegenden fast identischen Modell der atrophen Pseudarthrose nach acht Wochen (ohne ESWT) noch eine kontinuierliche Expression von TGF-β1 und bFGF im fibrösen Spaltbindegewebe vorhanden. In der Zusammenschau der Studie von Chen (2004) und der von Brownlow (2001) ergibt sich folgendes Bild:

In der Kontrollgruppe ist sowohl in einer nicht heilenden Defektzone nach 12 -- 16 Wochen eine kontinuierliche, lokale Aktivität von TGF-β1 nachgewiesen worden, als auch im Spalt der atrophen Pseudarthrose von Brownlow (2001). Folglich sollte man annehmen, dass sich dort Zellen befinden, die eine Expression vornehmen. Systemisch konnte dies hier möglicherweise aufgrund des geringen Anstieges nicht nachvollzogen werden.

Ein weiterer Marker im Knochenstoffwechsel ist das **bFGF** (basic Fibroblast Growth Factor), das entsprechend der Übersichtsarbeit von Solheim (1998) von Osteoblasten und Chondrozyten synthetisiert wird und im Zusammenspiel mit TGF-β1 bei der Frakturheilung eine Rolle spielt. Eine Untersuchung von Hausdorf konnte an Osteoblasten nach einer Stoßwellenexposition mit 250 und 500 Impulsen einer Energieflussdichte von 0,5 mJ/mm² in vitro eine signifikante Zunahme von bFGF zeigen, die auch mit der Anzahl der Impulse positiv korrelierte (Hausdorf and Maier, 2006).

In der Pseudarthrose-Studie von Brownlow (Brownlow et al., 2001) wurde eine Expression des bFGF durch Chondrozyten und dem Knochen anliegende Osteoblasten gesehen.

Weiss et al. (Weiss et al., 2002) konnte im Rahmen einer Distraktionsosteotomie einen signifikanten Anstieg von bFGF systemisch gegenüber der normalen Osteotomiespaltheilung an zehn Patienten zeigen.

Eine weitere Gruppe (Rabie and Lu, 2004) untersuchte die Wirkung von bFGF an einem

Mandibula-Defekt bei Kaninchen, wobei eine signifikante VEGF-Zunahme verzeichnet wurde. Dies sei der Vollständigkeit halber erwähnt.

Somit lässt sich Folgendes in die klinische Praxis übertragen:

Im vorliegenden Tierversuch lässt sich die atrophe Pseudarthrose durch eine Stoßwellentherapie positiv beeinflussen. In größer angelegten Tierversuchen sollte dieses Erkenntnis mit fest definierten Parametern unter Berücksichtigung der interindividuellen Unterschiede von Stoßwellenquellen weiter untersucht werden. Fallen auch zukünftige Ergebnisse positiv aus, könnte diese Behandlungsmethode in klinischen Studien unter pragmatischen Gesichtspunkten Einsatz finden. Unter Berücksichtigung der geforderten Energieflussdichte von $0,5 \text{ mJ/mm}^2$ könnte sich im Vergleich zur operativen Versorgung eine nebenwirkungsärmere Therapie ergeben.

Eine weitere Untersuchung von Knochenstoffwechsel-Markern im Serum in Kombination mit röntgenologischen und szintigraphischen Kontrollen wäre sowohl wissenschaftlich als auch klinisch sehr interessant.

5.3.3. Wertung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der eingangs genannten Hypothesen. Die Arbeit liefert aufgrund ihrer klaren Voraussetzungen (festgelegte Lokalisation der Pseudarthrose, Weite des Pseudarthrosespalts, Behandlungs- und Untersuchungszeitpunkte, Alter der Tiere sowie fehlende Vorerkrankung) zuverlässige Ergebnisse.

Die Anzahl der Tiere in der Versuchsgruppe ($n=6$) und in der Kontrollgruppe ($n=8$) ist aber nicht ausreichend für eine direkte Übertragung der vorliegenden Ergebnisse in die klinische Anwendung.

Somit sind weitere tierexperimentelle Studien mit größerer Fallzahl zu fordern.

Nur ergänzend sei für zukünftige tierexperimentelle Studien angemerkt, dass aufgrund des geringen Weichteilmantels an der Pin-Eintrittsstelle und hoher Belastung des Fixateur externe häufig mit lokalen Infektionen und mit dem Verbiegen der Pins gerechnet werden muss. Somit kommt es zu einer sehr hohen Ausfallquote der Versuchstiere.

6. Zusammenfassung

In der Urologie ist die fokussierte extrakorporale Lithotripsie am Nierenstein heutzutage Standardtherapie. Auch in der Orthopädie werden Stoßwellen in der Behandlung der Tendinosis calcarea, der Epikondylitis humeri radialis, der plantaren Fasciitis und der aseptischen Pseudarthrose angewendet. Bezüglich der drei erstgenannten orthopädischen Einsatzgebiete herrscht heute generell breite klinische Akzeptanz.

Die Vergleichbarkeit **klinischer Studien** zur fokussierten Stoßwellenbehandlung auf die atrophe Pseudarthrose ist nicht in allen Fällen möglich.

Bezüglich der jeweils verwendeten Stoßwellentechnik und -energie bestehen stark divergierende Angaben, oft wird die heute als zuverlässig betrachtete Energieflussdichte in der Fokusregion erst gar nicht angegeben. Auch bei der Lokalisation und dem Alter der Pseudarthrose zum Behandlungszeitpunkt beziehungsweise den Vorbehandlungen bestehen große Differenzen. Nicht zuletzt sind zwar die Ergebnisse überwiegend positiv, aber auch nicht einfach miteinander zu vergleichen.

Aus der eben geschilderten Situation ergibt sich die Unzufriedenheit, aus der die Idee zu dieser vorliegenden Arbeit entstand.

Alle Tiere (New-Zealand-White-Kaninchen, ex-breeder, Charles-River, Kislegg) wurden entsprechend dem Vorgehen von Brownlow und Simpson an der Tibia osteotomiert. Eine leichte Modifikation mit einem erweiterten Osteotomiespalt von 4 mm Breite und ein großzügigeres Abtragen des Periosts über 1 cm Breite proximal und distal der Osteotomie erschien in unseren Augen realistischer. Acht Wochen später wurden die Tiere anhand röntgenologischer Beurteilung (Exposcop 8000, Fa. Ziehm, Aufnahmespannung 75 kV, Stromstärke 3,7 mA) entsprechend in die Studie eingeschlossen. Über eine Randomisierung waren die Tiere in eine Versuchsgruppe mit ESWT und in eine Kontrollgruppe ohne ESWT eingeteilt. Die Versuchsgruppentiere behandelten wir mit einer Energieflussdichte von $0,5\text{mJ/mm}^2$ (XL-1, Dornier Medizintechnik, Wesling) und jeweils 750 Schuss im proximalen und 750 Schuss im distalen Bereich der atrophen Pseudarthrose bei einer Frequenz von 1 Hz. Die Beurteilung des weiteren Verlaufs erfolgte mittels Röntgenkontrollen (nach weiteren zwei und vier Wochen), aber auch

skelettszintigraphisch (^{99m}Tc -DPD, CIS bio international, Frankreich)(E.CAM, Siemens Medical Systems, Deutschland) direkt vor und vier Wochen nach Behandlung, woraus sich ein signifikanter Unterschied mit einer Zunahme des Knochenstoffwechsels in der Versuchsgruppe zeigte. Aus der Serumuntersuchung zu verschiedenen Wachstumsfaktoren konnte statistisch keine signifikante Änderung im Gruppenvergleich beobachtet werden, allerdings bei VEGF und Osteocalcin die erwarteten Änderungen zumindest in ihrer Tendenz bestätigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten in weiteren tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht werden. Für den Fall weiterer positiver Ergebnisse dieser nebenwirkungsarmen Methode könnte die fokussierte Stoßwellenbehandlung der atrophien Pseudarthrose in der klinischen Anwendung hilfreich sein.

7. Literaturverzeichnis

1. Albanese,SA, J A Spadaro, S E Chase, C W Geel, 1996, Bone growth after osteotomy and internal fixation in young rabbits: J.Orthrop.Res., v. 14, p. 921-926.
2. Bailey,MR, D T Blackstock, R O Cleveland, L A Crum, 1999, Comparison of electrohydraulic lithotripters with rigid and pressure-release ellipsoidal reflectors. II. Cavitation fields: J.Acoust.Soc.Am., v. 106, p. 1149-1160.
3. Beam,HA, J R Parsons, S S Lin, 2002, The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus: J.Orthrop Res., v. 20, p. 1210-1216.
4. Beutler,S, G Regel, H C Pape, S Machtens, A M Weinberg, I Kremeike, U Jonas, H Tscherne, 1999, [Extracorporeal shock wave therapy for delayed union of long bone fractures - preliminary results of a prospective cohort study]: Unfallchirurg, v. 102, p. 839-847.
5. Biedermann,R, A Martin, G Handle, T Auckenthaler, C Bach, M Krismer, 2003, Extracorporeal shock waves in the treatment of nonunions: J.Trauma, v. 54, p. 936-942.
6. Birnbaum,K, D C Wirtz, C H Siebert, K D Heller, 2002, Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of non-unions. A review of the literature: Arch.Orthrop.Trauma Surg., v. 122, p. 324-330.
7. Bourque,WT, M Gross, B K Hall, 1993, Expression of four growth factors during fracture repair: Int.J.Dev.Biol., v. 37, p. 573-579.
8. Bowles,SA, N Kurdy, A M Davis, M W France, D R Marsh, 1996, Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture:

Ann.Clin.Biochem., v. 33 (Pt 3), p. 196-200.

9. Brendel,W, 1986, Shock waves: a new physical principle in medicine: Eur.Surg.Res., v. 18, p. 177-180.
10. Brown,CW, T J Orme, H D Richardson, 1986, The rate of pseudarthrosis (surgical nonunion) in patients who are smokers and patients who are nonsmokers: a comparison study: Spine, v. 11, p. 942-943.
11. Brownlow,HC, A Reed, A H Simpson, 2001, Growth factor expression during the development of atrophic non-union: Injury, v. 32, p. 519-524.
12. Brownlow,HC, A H Simpson, 2000, Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits: J.Orthop.Res., v. 18, p. 438-442.
13. Buell,U, E Kleinhans, E Zorn-Bopp, W Reuschel, W Muenzing, E A Moser, M Seiderer, 1982, A comparison of bone imaging with Tc-99m DPD and Tc-99m MDP: concise communication: J.Nucl.Med., v. 23, p. 214-217.
14. Bulut,O, M Eroglu, H Ozturk, G Tezeren, S Bulut, E Koptagel, 2006, Extracorporeal shock wave treatment for defective nonunion of the radius: a rabbit model: J.Orthop.Surg.(Hong.Kong.), v. 14, p. 133-137.
15. Chaussy,C. Extracorporeal shock wave lithotripsy. 1982. Basel. Karger. 1982.
Ref Type: Conference Proceeding
16. Chaussy,C, W Brendel, E Schmiedt, 1980, Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves: Lancet, v. 2, p. 1265-1268.
17. Chen,HS, L M Chen, T W Huang, 2001, Treatment of painful heel syndrome with shock waves: Clin.Orthop.Relat Res., p. 41-46.
18. Chen,YJ, T Wurtz, C J Wang, Y R Kuo, K D Yang, H C Huang, F S Wang, 2004, Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in

the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats: J.Orthop Res., v. 22, p. 526-534.

19. Cho,TJ, L C Gerstenfeld, T A Einhorn, 2002, Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing: J.Bone Miner.Res., v. 17, p. 513-520.
20. Coleman,AJ, E Draguioti, R Tiptaf, N Shotri, J E Saunders, 1998, Acoustic performance and clinical use of a fibreoptic hydrophone: Ultrasound Med.Biol., v. 24, p. 143-151.
21. D'Alonzo,RC, A J Kowalski, D T Denhardt, G A Nickols, N C Partridge, 2002, Regulation of collagenase-3 and osteocalcin gene expression by collagen and osteopontin in differentiating MC3T3-E1 cells: J.Biol.Chem., v. 277, p. 24788-24798.
22. Daecke,W, D Kusnierczak, M Loew, 2002, [Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) in tendinosis calcarea of the rotator cuff. Long-term results and efficacy]: Orthopade, v. 31, p. 645-651.
23. Delacretaz,G, K Rink, G Pittomvils, J P Lafaut, H Vandeursen, R Boving, 1995, Importance of the implosion of ESWL-induced cavitation bubbles: Ultrasound Med.Biol., v. 21, p. 97-103.
24. Delius,M, 1994, Medical applications and bioeffects of extracorporeal shock waves: Shock waves, v. 4, p. 55-72.
25. Delius,M, 1995, [Biological effect of shock waves--more than "just" lithotripsy?]: Zentralbl.Chir, v. 120, p. 259-273.
26. Delius,M, 2000, Lithotripsy: Ultrasound Med.Biol., v. 26 Suppl 1, p. S55-S58.
27. Delius,M, 2002, Twenty years of shock wave research at the Institute for Surgical Research: Eur.Surg.Res., v. 34, p. 30-36.

28. Delius,M, K Draenert, Y Al Diek, Y Draenert, 1995, Biological effects of shock waves: in vivo effect of high energy pulses on rabbit bone: *Ultrasound Med.Biol.*, v. 21, p. 1219-1225.
29. Delius,M, F Ueberle, W Eisenmenger, 1998, Extracorporeal shock waves act by shock wave-gas bubble interaction: *Ultrasound Med.Biol.*, v. 24, p. 1055-1059.
30. dos Santos Neto,FL, J B Volpon, 1984, Experimental nonunion in dogs: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 260-271.
31. Eckardt,H, M Ding, M Lind, E S Hansen, K S Christensen, I Hvid, 2005, Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model: *J.Bone Joint Surg.Br.*, v. 87, p. 1434-1438.
32. Eggli,S, E Scholl, R Hertel, 1998, [Management of IIIB open tibial fractures by early osteosynthesis and local muscle flap]: *Unfallchirurg*, v. 101, p. 674-683.
33. Eisenberger,F, C Chaussy, 1978, Contact-free renal stone fragmentation with shock waves: *Urol.Res.*, v. 6, p. 111.
34. Ferrara,N, 2004, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress: *Endocr.Rev.*, v. 25, p. 581-611.
35. Folberth,W, G Kohler, A Rohwedder, E Matura, 1992, Pressure distribution and energy flow in the focal region of two different electromagnetic shock wave sources: *J.Stone.Dis.*, v. 4, p. 1-7.
36. Ford,JL, D E Robinson, B E Scammell, 2004, Endochondral ossification in fracture callus during long bone repair: the localisation of 'cavity-lining cells' within the cartilage: *J.Orthop.Res.*, v. 22, p. 368-375.
37. Forssmann,B, W Hepp, C Chaussy, F Eisenberger, K Wanner, 1977, [A method for no-contact destruction of kidney stones by means of shock waves (author's transl)]: *Biomed.Tech.(Berl)*, v. 22, p. 164-168.

38. Fritze,J, 1998, [Extracorporeal shockwave therapy (ESWT) in orthopedic indications: a selective review]: *Versicherungsmedizin*, v. 50, p. 180-185.
39. Gerdesmeyer,L, M Maier, M Haake, C Schmitz, 2002, [Physical-technical principles of extracorporeal shockwave therapy (ESWT)]: *Orthopade*, v. 31, p. 610-617.
40. Gerdesmeyer,L, S Wagenpfeil, M Haake, M Maier, M Loew, K Wortler, R Lampe, R Seil, G Handle, S Gassel, J D Rompe, 2003, Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial: *JAMA*, v. 290, p. 2573-2580.
41. Graff,J. Die Wirkung hochenergetischer Stoßwellen auf Knochen und Weichteilgewebe. 1989. Ruhr Universität Bochum.
Ref Type: Thesis/Dissertation
42. Gunalp,B, M Ozguven, E Ozturk, B Ercenk, H Bayhan, 1992, Role of bone scanning in the management of non-united fractures: a clinical study: *Eur.J.Nucl.Med.*, v. 19, p. 845-847.
43. Hain,SF, M J O'Doherty, M A Smith, 2002, Functional imaging and the orthopaedic surgeon: *J.Bone Joint Surg.Br.*, v. 84, p. 315-321.
44. Haist,J, W Reichel, R Bürger, U Witzsch, 1993, Einsatz der extrakorporealen Stoßwelle bei der osteosynthetisch versorgten Pseudarthrose - eine experimentelle Studie: *Orthop Praxis*, v. 29, p. 345-347.
45. Hammer,DS, S Rupp, S Ensslin, D Kohn, R Seil, 2000, Extracorporeal shock wave therapy in patients with tennis elbow and painful heel: *Arch.Orthop.Trauma Surg.*, v. 120, p. 304-307.
46. Hankemeier,S, S Grassel, G Plenz, H U Spiegel, P Bruckner, A Probst, 2001, Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages: *J.Orthop Res.*, v. 19, p. 531-538.

47. Harrison,LJ, J L Cunningham, L Stromberg, A E Goodship, 2003, Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model: J.Orthrop Trauma, v. 17, p. 11-21.
48. Hausdorf,J, M Maier, 2006, Extracorporeal shock waves and bone: can we shock the cells into growth?: Future rheumatology, v. 1, p. 159-162.
49. Hausdorf,J, C Schmitz, B Averbek, M Maier, 2004, [Molecular basis for pain mediating properties of extracorporeal shock waves]: Schmerz., v. 18, p. 492-497.
50. Häusler,E, W Kiefer, 1971, Anregung von Stoßwellen in Flüssigkeiten durch Hochgeschwindigkeitswassertropfen: Verhandlungen Deutsche Physikalische Gesellschaft, v. 6.
51. Hendler,A, M Hershkop, 1998, When to use bone scintigraphy. It can reveal things other studies cannot: Postgrad.Med., v. 104, p. 54-61, 65.
52. Hsu,RW, W H Hsu, C L Tai, K F Lee, 2004, Effect of shock-wave therapy on patellar tendinopathy in a rabbit model: J.Orthrop.Res., v. 22, p. 221-227.
53. Ikeda,K, K Tomita, K Takayama, 1999, Application of extracorporeal shock wave on bone: preliminary report: J.Trauma, v. 47, p. 946-950.
54. Iro,H, N Nitsche, H T Schneider, C Ell, 1989, Extracorporeal shockwave lithotripsy of salivary gland stones: Lancet, v. 2, p. 115.
55. Johannes,EJ, D M Kaulesar Sukul, E Matura, 1994, High-energy shock waves for the treatment of nonunions: an experiment on dogs: J.Surg.Res., v. 57, p. 246-252.
56. Kanaan,RA, L A Kanaan, 2006, Transforming growth factor beta1, bone connection: Med.Sci.Monit., v. 12, p. RA164-RA169.
57. Ko,JY, H S Chen, L M Chen, 2001, Treatment of lateral epicondylitis of the elbow with shock waves: Clin.Orthrop.Relat Res., p. 60-67.

58. Krause,H, 1997, Physik und Technik medizinischer Stosswellensysteme, in JD Rompe (ed), Extrakorporale Stoßwellentherapie: Weinheim, Chapman and Hall, p. 15-34.
59. Kremer,EA, Y Chen, K Suzuki, H Nagase, J P Gorski, 1998, Hydroxyapatite induces autolytic degradation and inactivation of matrix metalloproteinase-1 and -3: J.Bone Miner.Res., v. 13, p. 1890-1902.
60. Kudo,P, K Dainty, M Clarfield, L Coughlin, P Lavoie, C Lebrun, 2006, Randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial evaluating the treatment of plantar fasciitis with an extracorporeal shockwave therapy (ESWT) device: a North American confirmatory study: J.Orthop.Res., v. 24, p. 115-123.
61. Lu,C, T Miclau, D Hu, E Hansen, K Tsui, C Puttlitz, R S Marcucio, 2005, Cellular basis for age-related changes in fracture repair: J.Orthop Res., v. 23, p. 1300-1307.
62. Maes,C, P Carmeliet, K Moermans, I Stockmans, N Smets, D Collen, R Bouillon, G Carmeliet, 2002, Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188: Mech.Dev., v. 111, p. 61-73.
63. Maier,M, J A Freed, S Milz, C Pellengahr, C Schmitz, 2003, [Detection of bone fragments in pulmonary vessels following extracorporeal shock wave application to the distal femur in an in-vivo animal model]: Z.Orthop Ihre Grenzgeb., v. 141, p. 223-226.
64. Maier,M, S Milz, T Tischer, W Munzing, N Manthey, A Stabler, N Holzknecht, C Weiler, A Nerlich, H J Refior, C Schmitz, 2002a, Influence of extracorporeal shock-wave application on normal bone in an animal model in vivo. Scintigraphy, MRI and histopathology: J.Bone Joint Surg.Br., v. 84, p. 592-599.
65. Maier,M, S Milz, D C Wirtz, J D Rompe, C Schmitz, 2002b, [Basic research of applying extracorporeal shockwaves on the musculoskeletal system. An assessment of current status]: Orthopade, v. 31, p. 667-677.

66. Maier,M, T Saisu, J Beckmann, M Delius, F Grimm, V Hupertz, S Milz, A Nerlich, H J Refior, C Schmitz, F Ueberle, C Weiler, K Messmer, 2001a, Impaired tensile strength after shock-wave application in an animal model of tendon calcification: *Ultrasound Med.Biol.*, v. 27, p. 665-671.
67. Maier,M, A Stabler, A Lienemann, S Kohler, A Feitenhansl, H R Durr, M Pfahler, H J Refior, 2000a, Shockwave application in calcifying tendinitis of the shoulder-- prediction of outcome by imaging: *Arch.Orthop.Trauma Surg.*, v. 120, p. 493-498.
68. Maier,M, M Steinborn, C Schmitz, A Stabler, S Kohler, M Pfahler, H R Durr, H J Refior, 2000b, Extracorporeal shock wave application for chronic plantar fasciitis associated with heel spurs: prediction of outcome by magnetic resonance imaging: *J.Rheumatol.*, v. 27, p. 2455-2462.
69. Maier,M, M Steinborn, C Schmitz, A Stabler, S Kohler, A Veihelmann, M Pfahler, H J Refior, 2001b, Extracorporeal shock-wave therapy for chronic lateral tennis elbow-- prediction of outcome by imaging: *Arch.Orthop.Trauma Surg.*, v. 121, p. 379-384.
70. Maier,M, F Ueberle, G Rupprecht, 1998, [Physical parameters of extracorporeal shock waves]: *Biomed.Tech.(Berl)*, v. 43, p. 269-274.
71. Marchi,E, F S Vargas, M M Acencio, L Antonangelo, L R Teixeira, E H Genofre, R W Light, 2004, Talc and silver nitrate induce systemic inflammatory effects during the acute phase of experimental pleurodesis in rabbits: *Chest*, v. 125, p. 2268-2277.
72. Mayer,H, H Bertram, W Lindenmaier, T Korff, H Weber, H Weich, 2005, Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation: *J.Cell Biochem.*, v. 95, p. 827-839.
73. Melikyan,EY, E Shahin, J Miles, L C Bainbridge, 2003, Extracorporeal shock-wave treatment for tennis elbow. A randomised double-blind study: *J.Bone Joint Surg.Br.*, v. 85, p. 852-855.

74. Nakajima,F, A Ogasawara, K Goto, H Moriya, Y Ninomiya, T A Einhorn, M Yamazaki, 2001, Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor: J.Orthrop Res., v. 19, p. 935-944.
75. Ogden,JA, R Alvarez, R Levitt, G L Cross, M Marlow, 2001a, Shock wave therapy for chronic proximal plantar fasciitis: Clin.Orthrop.Relat Res., p. 47-59.
76. Ogden,JA, A Toth-Kischkat, R Schultheiss, 2001b, Principles of shock wave therapy: Clin.Orthrop.Relat Res., p. 8-17.
77. Paccione,MF, S M Warren, J A Spector, J A Greenwald, P J Bouletreau, M T Longaker, 2001, A mouse model of mandibular osteotomy healing: J.Craniofac.Surg., v. 12, p. 444-450.
78. Pauwels,EK, M P Stokkel, 2001, Radiopharmaceuticals for bone lesions. Imaging and therapy in clinical practice: Q.J.Nucl.Med., v. 45, p. 18-26.
79. Philipp,A, W Lauterborn, 1998, Cavitation erosion by single laser-produced bubbles: Journal of Fluid Mechanics, v. 361, p. 75-116.
80. Rabie,MBA, M Lu, 2004, Basic fibroblast growth factor up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor during healing of allogeneic bone graft: Archieves of oral Biology, v. 49, p. 1025-1033.
81. Rahmanzadeh,R, A Meißner. Störungen der Frakturheilung. 9. Steglitzer Unfalltagung. 1991. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
Ref Type: Generic
82. Rassweiler,JJ, C Renner, C Chaussy, S Thuroff, 2001, Treatment of renal stones by extracorporeal shockwave lithotripsy: an update: Eur.Urol., v. 39, p. 187-199.
83. Richter,J, W Schulze, G Muhr, 2000, [Diaphyseal femur pseudarthroses--only a technical problem?]: Chirurg, v. 71, p. 1098-1106.

84. Rompe,JD, 1997, Tierexperimentelle und klinische Ergebnisse der Stoßwellentherapie am Knochen, in W Siebert and M Buch (eds), Stoßwellenanwendungen am Knochen - Klinische und experimentelle Erfahrungen: Hamburg, Dr. Kovac, p. 38-39.
85. Rompe,JD, P Eysel, C Hopf, J Vogel, K Kullmer, 1997, [Extracorporeal shockwave treatment of delayed bone healing. A critical assessment]: Unfallchirurg, v. 100, p. 845-849.
86. Rompe,JD, T Rosendahl, C Schollner, C Theis, 2001a, High-energy extracorporeal shock wave treatment of nonunions: Clin.Orthop.Relat Res., p. 102-111.
87. Rompe,JD, J Zoellner, B Nafe, 2001b, Shock wave therapy versus conventional surgery in the treatment of calcifying tendinitis of the shoulder: Clin.Orthop.Relat Res., p. 72-82.
88. Runkel,M, P M Rommens, 2000, [Pseudoarthrosis]: Unfallchirurg, v. 103, p. 51-63.
89. Saadeh,PB, B J Mehrara, D S Steinbrech, M E Dudziak, J A Greenwald, J S Luchs, J A Spector, H Ueno, G K Gittes, M T Longaker, 1999, Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts: Am.J.Physiol, v. 277, p. C628-C637.
90. Sasaki,K, M Takagi, Y T Konttinen, A Sasaki, Y Tamaki, T Ogino, S Santavirta, J Salo, 2007, Upregulation of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and its activator MMP-3 of human osteoblast by uniaxial cyclic stimulation: J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater., v. 80, p. 491-498.
91. Sauerbruch,T, M Delius, G Paumgartner, J Holl, O Wess, W Weber, W Hepp, W Brendel, 1986, Fragmentation of gallstones by extracorporeal shock waves: N.Engl.J.Med., v. 314, p. 818-822.
92. Sauerbruch,T, J Holl, M Sackmann, R Werner, R Wotzka, G Paumgartner, 1987, Disintegration of a pancreatic duct stone with extracorporeal shock waves in a patient

with chronic pancreatitis: Endoscopy, v. 19, p. 207-208.

93. Schaden,W, A Fischer, A Sailer, 2001, Extracorporeal shock wave therapy of nonunion or delayed osseous union: Clin.Orthop.Relat Res., p. 90-94.
94. Schleberger,R, 1995, Anwendung der extrakorporalen Stoßwelle am Stütz- und Bewegungsapparat im mittlereenergetischen Bereich, in C Chaussy, F Eisenberger, D Jochum, and D Wilbert (eds), Die Stoßwelle - Forschung und Klinik: Tuebingen, Attempo, p. 166-174.
95. Schleberger,R, T Senge, 1992, Non-invasive treatment of long-bone pseudarthrosis by shock waves (ESWL): Arch.Orthop.Trauma Surg., v. 111, p. 224-227.
96. Schroth,HJ, F Hausinger, H Garth, E Oberhausen, 1984, Comparison of the kinetics of methylene-diphosphonate (MDP) and dicarboxypropan-diphosphonic acid (DPD), two radio-diagnostics for bone scintigraphy: Eur.J.Nucl.Med., v. 9, p. 529-532.
97. Schuemichen,C, T Krause, G Umbach, T Wolff, 1988, Localization of ^{99m}Tc-diphosphonates in newly formed bone matrix as a measure of bone lesion detectability: Nuklearmedizin, v. 27, p. 8-11.
98. Seebeck,P, H J Bail, C Exner, H Schell, R Michel, H Amthauer, H Bragulla, G N Duda, 2005, Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing?: Bone, v. 37, p. 669-677.
99. Sems,A, R Dimeff, J P Iannotti, 2006, Extracorporeal shock wave therapy in the treatment of chronic tendinopathies: J.Am.Acad.Orthop.Surg., v. 14, p. 195-204.
100. Solheim,E, 1998, Growth factors in bone: Int.Orthop., v. 22, p. 410-416.
101. Sonne-Holm,S, P Nordkild, M Dyrbye, J S Jensen, 1987, The predictive value of bone scintigraphy after internal fixation of femoral neck fractures: Injury, v. 18, p. 33-35.
102. Southwood,LL, D D Frisbie, C E Kawcak, C W McIlwraith, 2003, Evaluation of

- serum biochemical markers of bone metabolism for early diagnosis of nonunion and infected nonunion fractures in rabbits: *Am.J.Vet.Res.*, v. 64, p. 727-735.
103. Staudenraus,I, W Eisenmenger, 1993, Fibre-optic probe hydrophone for ultrasonic and shock-wave measurements in water: *Ultrasonics*, v. 31, p. 267-273.
 104. Steinbrech,DS, B J Mehrara, N M Rowe, M E Dudziak, J S Luchs, P B Saadeh, G K Gittes, M T Longaker, 2000, Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats: *Plast.Reconstr.Surg.*, v. 105, p. 2028-2038.
 105. Stoffel,K, H Engler, M Kuster, W Riesen, 2007, Changes in biochemical markers after lower limb fractures: *Clin.Chem.*, v. 53, p. 131-134.
 106. Street,J, M Bao, L deGuzman, S Bunting, F V Peale, Jr., N Ferrara, H Steinmetz, J Hoeffel, J L Cleland, A Daugherty, N van Bruggen, H P Redmond, R A Carano, E H Filvaroff, 2002, Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 99, p. 9656-9661.
 107. Stürmer,KM, 1996, Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung: *Orthopäde*, v. 25, p. 386-393.
 108. Subramanian,G, J G McAfee, F D Thomas, T A Feld, C Zapf-Longo, E Palladino, 1983, New diphosphonate compounds for skeletal imaging: comparison with methylene diphosphonate: *Radiology*, v. 149, p. 823-828.
 109. Thiel,M, 2001, Application of shock waves in medicine: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 18-21.
 110. Thompson,Z, T Miclau, D Hu, J A Helms, 2002, A model for intramembranous ossification during fracture healing: *J.Orthop Res.*, v. 20, p. 1091-1098.
 111. Tischer,T, S Milz, H Anetzberger, P E Muller, D C Wirtz, C Schmitz, F Ueberle, M

- Maier, 2002, [Extracorporeal shock waves induce ventral-periosteal new bone formation out of the focus zone--results of an in-vivo animal trial]: *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.*, v. 140, p. 281-285.
112. Ueberle,F, 1997, Acoustic pressure parameters of pressure pulse sources used in lithotripsy and pain therapy, in C Chaussy, F Eisenberger, D Jocham, and D Wilbert (eds), *High energy shock waves in orthopaedics*: Stuttgart, New York, Springer, p. 76-85.
 113. Valchanou,VD, P Michailov, 1991, High energy shock waves in the treatment of delayed and nonunion of fractures: *Int.Orthop.*, v. 15, p. 181-184.
 114. Van Arsdalen,KN, S Kurzweil, J Smith, R M Levin, 1991, Effect of lithotripsy on immature rabbit bone and kidney development: *J.Urol.*, v. 146, p. 213-216.
 115. Vogel,J, J D Rompe, C Hopf, J Heine, R Burger, 1997, [High-energy extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of pseudarthrosis]: *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.*, v. 135, p. 145-149.
 116. Volpon,JB, 1994, Nonunion using a canine model: *Arch.Orthop.Trauma Surg.*, v. 113, p. 312-317.
 117. Vorne,M, S Vahatalo, T Lantto, 1983, A clinical comparison of ^{99m}Tc-DPD and two ^{99m}Tc-MDP agents: *Eur.J.Nucl.Med.*, v. 8, p. 395-397.
 118. Wallace,AL, R K Strachan, A Blane, J J Best, S P Hughes, 1992, Quantitative early phase scintigraphy in the prediction of healing of tibial fractures: *Skeletal Radiol.*, v. 21, p. 241-245.
 119. Wang,CJ, H S Chen, C E Chen, K D Yang, 2001a, Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 95-101.
 120. Wang,CJ, J Y Ko, H S Chen, 2001b, Treatment of calcifying tendinitis of the shoulder with shock wave therapy: *Clin.Orthop.Relat Res.*, p. 83-89.

121. Wang,CJ, F S Wang, K D Yang, L H Weng, C C Hsu, C S Huang, L C Yang, 2003, Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits: J.Orthrop Res., v. 21, p. 984-989.
122. Wang,CJ, F S Wang, K D Yang, L H Weng, Y C Sun, Y J Yang, 2005, The effect of shock wave treatment at the tendon-bone interface-an histomorphological and biomechanical study in rabbits: J.Orthrop.Res., v. 23, p. 274-280.
123. Wang,FS, C J Wang, Y J Chen, P R Chang, Y T Huang, Y C Sun, H C Huang, Y J Yang, K D Yang, 2004, Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts: J.Biol.Chem., v. 279, p. 10331-10337.
124. Wang,FS, C J Wang, H J Huang, H Chung, R F Chen, K D Yang, 2001c, Physical shock wave mediates membrane hyperpolarization and Ras activation for osteogenesis in human bone marrow stromal cells: Biochem.Biophys.Res.Comm., v. 287, p. 648-655.
125. Wang,FS, K D Yang, R F Chen, C J Wang, S M Sheen-Chen, 2002, Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1: J.Bone Joint Surg.Br., v. 84, p. 457-461.
126. Wang,JS, 1996, Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants: Acta Orthop.Scand.Suppl, v. 269, p. 1-33.
127. Weber,BG, O Cech. Pseudarthrosen. Pathophysiologie, Biomechanik, Therapie, Ergebnisse. 1973. Bern Stuttgart Wien, Verlag Hans Huber.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
128. Weiss,S, R Baumgart, M Jochum, C J Strasburger, M Bidlingmaier, 2002, Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors: J.Bone Miner.Res., v. 17, p. 1280-1289.

129. Weiss,S, G Zimmermann, R Baumgart, P Kasten, M Bidlingmaier, P Henle, 2005, Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration-- distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing: Bone, v. 37, p. 781-790.
130. Wess,O, 2004, Physikalische Grundlagen der extrakorporalen Stoßwellentherapie: Journal für Mineralstoffwechsel, v. 11, p. 7-18.
131. Wess,O, F Ueberle, R N Dührssen, D Hilcken, W Krauss, T Reuner, R Schulheiss, I Staudenraus, M Rattner, W Haaks, B Granz, 1997, Working group technical developments - consensus report, in C Chaussy, F Eisenberger, D Jocham, and D Wilbert (eds), High energy shock waves in medicine: Stuttgart, New York, Thieme, p. 59-71.
132. Williams,JC, Jr., M A Stonehill, K Colmenares, A P Evan, S P Andreoli, R O Cleveland, M R Bailey, L A Crum, J A McAteer, 1999a, Effect of macroscopic air bubbles on cell lysis by shock wave lithotripsy in vitro: Ultrasound Med.Biol., v. 25, p. 473-479.
133. Williams,JC, Jr., J F Woodward, M A Stonehill, A P Evan, J A McAteer, 1999b, Cell damage by lithotripter shock waves at high pressure to preclude cavitation: Ultrasound Med.Biol., v. 25, p. 1445-1449.
134. Wolfrum,B, C Ohl, R Mettin, T Kurz, W Lauterborn. Die Bedeutung von Kavitationsblasen für transiente Membranpermeabilisierung und Zellschädigung. DAGA _03. 2003. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Akustik.
Ref Type: Conference Proceeding

Anhang

I Übersicht tierexperimenteller und klinischer Studien

	Autor	Jahr	Behandlungsort	Gerät	Parameter	Ergebnis
Tierart					i=Impulse	
Ratte	Yeaman	1989	Epiphyse (Tibia)	XL1	1500i, 20kV	Wachstumsänderung
	Schleeberger	1992	Diaphyse	HM-3	2000i, 18kV	Beschleunigte Heilung
	Haupt	1992	Frakturmodell Humerus	XL1	500i, 14/18kV	Beschleunigte Heilung
Kaninchen	Van Arsdalen	1991	Epiphyse (Femur)	HM-3	1000i, 18kV	keine Wachstumsbeeinträchtigung
	Delius	1995	Physiologisches Knochenmodell (Femur)	XL1	1500i, 27,5 kV	Knochenneubildung
	Mc Cormack	1996	Osteotomiemodell Radius			Knochenneubildung, aber verzögerte Heilung
	Uslu	1999	Knochendefekt (Radius)	Elmed	1000i, 14kV	vermehrte Kallusbildung
	Maier	2002	phys. Knochenmodell (Femur)	XL1	1500i, 0,0; 0,5; 0,9 mJ/mm ²	Knochenneubildung, bei 0,9 mJ/mm ² aber Mikrofrakturierung
	Tischer	2002	phys. Knochenmodell (Femur)	XL1	1500i, 0,0; 0,9; 1,2 mJ/mm ²	Knochenneubildung außerhalb Fokus Gebiet
	Maier	2003	phys. Knochenmodell (Femur)	XL1	1500i, 0,5; 0,9 mJ/mm ²	Substanz-P-Erhöhung
	Maier	2003	Femur	XL1	1500i, 0,9 mJ/mm ²	Knochenfragmente in Lunge
	Narasaki	2003	Tibia-Distraktionsmodell		3000i x 2, 0,42 mJ/mm ²	mehr Kortikalis in ESWT-Gruppe
	Wang	2003	Sehnen-Knochen-Übergang			Neovaskularisation
	Hsu	2004	Tendinopathie Patella		1500i, 0,29mJ/mm ²	vermehrte Kollagensynthese

	Wang	2004	Femur Fraktur		2000i, 0,18 4000i, 0,47	Mineralisierungsgehalt im Knochen erhöht
	Hausdorf	2004	Femur	XL1	1500i, 0,9mJ/mm ²	Substanz-P-Erhöhung
	Wang	2005	Knie		500i, 14kV	Bessere Heilung von Knochen-Sehnen-Übergang
	Bulut	2006	Radius Pseudarthrose Modell		1000i, 0,46 mJ/mm ²	Höhere Heilungsrate
Schaf	Forriol	1994	Osteotomiemodell (Tibia)	Siemens Osteostar	500i, 0,47-1,2 mJ/mm ²	Verzögerte Knochenheilung
	Augat	1995	Osteotomiemodell (Tibia)	XL2	300,1000, 3000i, 12- 16kV	
Hund	Johannes	1994	Pseudarthrose (Radius)	Siemens Osteostar	4000i, 0,54 mJ/mm ²	schnellere Knochenheilung
	Ikeda	1999	phys. Knochenmodell (Femur)	experimentell	100-1000i, 10- 40 mJ/mm ²	Knochenschäden, Osteoneogenese
	Wang	2001	Frakturmodell (Tibia)	Ossatron	2000i, 14kV	vermehrte Kallus-bildung, schnellere Frakturheilung
	Wang	2002	Sehneninsertion (Achillessehne)		1000i, 0,18mJ/mm ²	kein Einfluss auf Knochen
Ratte	Wang	2003	Defekt (Femur)		500i, 0,16mJ/mm ²	Anstieg von BMP lokal
	Chen	2004			500i, 0,16mJ/mm ²	MAPK und p38 Aktivierung
	Chen	2004			500i, 0,16mJ/mm ²	VEGF und TGF-β1 Expression in Osteoblasten steigt
Pferd	Bischofberger	2006	Metatarsale-4-Kochen		2000i, 0,15mJ/mm ²	Erhöhung Osteoblasten Anzahl und Szintianreicherung

Tabelle 3 Studien (in vivo) zur Wirkung der extrakorporalen Stoßwelle auf Knochengewebe – intaktes und pathologisches – aus einer Pub-med-Recherche vom 11.01.2007. Weitere Erläuterung unter Ergebnisdiskussion.

Valanchou	1991	Pseudarthrose	HM3	1000-4000i, 1000-1700 bar	hohe Heilungsrate (85%)
Schleberger	1992	Pseudarthrose	HM3, Dornier MFL 5000	2000i, 18 kV	gute Heilungstendenz
Schleberger	1995	Pseudarthrose	MFL 5000	2000i, 18kV	hohe Heilungsrate (91%)
Haist	1995	Pseudarthrose		2000-10000i, variabel	gute Heilungstendenz
Haupt, Katzenmaier	1995	Pseudarthrose	Ossatron	3000i, 28kV	gute Heilungstendenz
Diesch, Haupt	1997	Pseudarthrose	Ossatron, MFL 5000	2000-3000i, 0,3- 0,5 mJ/mm ²	gute Heilungstendenz
Russo	1997	Pseudarthrose	Modulith SLV	variabel i, 0,2- 1,0 mJ/mm ²	gute Heilungstendenz
Rompe	1997	Pseudarthrose	Siemens Osteostar	3000i, 0,6 mJ/mm ²	mittlere Heilungstendenz
Beutler	1999	Pseudarthrose		2000i, 18kV	Heilungshinweise (41%)
Wang	2001	Pseudarthrose	Ossatron	1000-6000i, 0,47 - 0,62mJ/mm ²	80% Heilungsrate nach 12 Monaten
Rompe	2001	Pseudarthrose (Tibia / Femur)		3000i, 0,6mJ/mm ²	hohe Durchbauungsraten
Schoellner	2002	Pseudarthrose	Siemens Osteo-star	3000i, 0,6mJ/mm ²	deutliche Pseudarthrosen Heilung
Schatz	2002	kongenitale Pseudarthrose			Heilung
Biedermann	2003	Pseudarthrose	MFL 5000 Dornier	2900i, 0,7mJ/mm ²	62% Heilung für hyper- und 50% für atrophe Pseud- arthrose, 5,3 Monate Schnitt
Rompe	2004	Pseudarthrose		3000i, 0,6mJ/mm ²	hohe Durchbauungsrate

Tabelle 4 Klinische Studien zur Wirkung der extrakorporalen Stoßwellentherapie auf Pseudarthrosen beim Menschen, Pub-med-Recherche vom 11.01.2007.

II Gesamttabelle Übersicht

Tier	233	358	2277	2370
ESWT	nein	nein	nein	nein
Röntgenbeurteilung Tag 28	komplette Durchbauung	keine Durchbauung	keine Durchbauung	partielle Durchbauung
SZ Mischphase 28/0	1,05	1,29	1,03	1,24
SZ statisch 28/0	1,03	1,17	1,04	0,96
Osteocalcin (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	7	10	11	9
	8	7	10	8
	9	7	9	9
	11	5	10	7
	10	6	11	6
	10	8	9	8
bFGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	41	11	53	33
	29	14	48	21
	28	17	37	17
	30	18	46	20
	55	24	55	11
	41	11	52	20
TGF-β1 (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	2,7		3,6	
	2,3		2,7	
	2,2		2,5	
	2,4		2,5	
	2,9		2,5	
	2,7		1,7	
VEGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28				
				3,1
				2,4
				2,1
				2,4

SZ = Szintigraphie

28/0 = Quotient:

(ROI Osteotomie Tag 28/ ROI kontralat. Tag 28) / (ROI Ost. Tag 0 / ROI kont. Tag 0)

Tier	2371	3352	4303	4334
ESWT	nein	nein	nein	nein
Röntgenbeurteilung Tag 28	keine Durchbauung	partielle Durchbauung	partielle Durchbauung	keine Durchbauung
SZ Mischphase 28/0	0,71	0,82	1,04	0,90
SZ statisch 28/0	0,97	0,88	1,09	0,90
Osteocalcin (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	11	12	7	10
	9	8	7	8
	9	7	5	7
	10	13	5	8
	8	9	9	10
	19	11	8	10
bFGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	27	17	12	60
	24	19	14	45
	21	18	15	58
	28	12	11	53
	16	19	15	70
	19	44	15	45
TGF-β1 (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28				2,4
				1,7
				1,7
				3,0
				2,6
				2,0
VEGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	2,4	8,4	2,9	
	3,9	11,4	2,8	
		9,8	2,8	
	1,7	8,4	8,4	
	3,7	7,9	2,4	
	4,0	5,8	3,8	

SZ = Szintigraphie

28/0 = Quotient:

(ROI Osteotomie Tag 28/ ROI kontralat. Tag 28) / (ROI Ost. Tag 0 / ROI kont. Tag 0)

Tier	474	1181	1331	2234
ESWT	ja	ja	ja	ja
Röntgenbeurteilung Tag 28	partielle Durchbauung	komplette Durchbauung	komplette Durchbauung	partielle Durchbauung
SZ Mischphase 28/0	0,98	1,31	0,74	1,27
SZ statisch 28/0	1,20	1,10	1,03	2,03
Osteocalcin (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	14	11	12	10
	7	9		
	14	11	8	9
	14	9	9	8
	14	7		11
	14	6	16	16
bFGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	50	38	18	23
	24	38		25
	31	26	16	
	27	30	47	27
	27	35	13	25
	24	47	9	23
TGF-β1 (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	2,9	2,0		
	2,4	1,8		
	2,9	1,6		
	2,7	1,9		
	2,6	2,8		
	2,3	3,1		
VEGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28		4,5	3,1	
		2,1		
		24,4	8,7	
		15,2	10,6	
		29,0	7,9	
		17,5	3,8	

SZ = Szintigraphie

28/0 = Quotient:

(ROI Osteotomie Tag 28/ ROI kontralat. Tag 28) / (ROI Ost. Tag 0 / ROI kont. Tag 0)

Tier	3258	4351
ESWT	ja	ja
Röntgenbeurteilung Tag 28	komplette Durchbauung	partielle Durchbauung
SZ Mischphase 28/0	1,41	1,29
SZ statisch 28/0	1,09	1,32
Osteocalcin (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	12	13
		11
	16	8
	13	11
	16	10
	12	14
bFGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	17	28
		17
	32	21
	38	22
	33	31
	47	14
TGF-β1 (ng/ml) Tag 0,1,3,7,14,28	2,8	
	2,5	
	2,2	
	2,5	
	2,5	
VEGF (pg/ml) Tag 0,1,3,7,14,28		
		2,4
		3,3
		6,6
		9,3
		1,0

SZ = Szintigraphie

28/0 = Quotient:

(ROI Osteotomie Tag 28/ ROI kontralat. Tag 28) / (ROI Ost. Tag 0 / ROI kont. Tag 0)

III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung:	Seite:
1. Graphische Darstellung einer standardisierten Stoßwelle	6
2. Elektrohydraulische Stoßwellenquelle im Querschnitt	8
3. Zündkerze der elektrohydraulischen Stoßwellenquelle	8
4. Schema einer elektromagnetischen Stoßwellenquelle	8
5. Schema einer piezoelektrischen Stoßwellenquelle	9
6. Darstellung des Stoßwellenfokus hochenergetisch – Grafik	12
7. Darstellung des Stoßwellenfokus niederenergetisch – Grafik	13
8. Kavitationsblase – mikroskopisch und grafisch	17
9. Pseudarthrosenklassifikation – eine Übersicht	21
10. Behandlungsstrategien der Pseudarthrose	22
11. Induktion einer Pseudarthrose – Übersicht	25
12. Osteotomie Kaninchentibia (Photo) – Devaskularisation	28
13. Osteotomie Kaninchentibia (Photo) – Fixateur externe	29
14. Aufbau der Stoßwellenbehandlung – Schemazeichnung	31
15. Stoßwellenbehandlung – Detailphoto	32
16. Szintigraphische Messung (Photo)	35
17. Röntgenauswertung – Balkendiagramm	42
18. Röntgendokumentation Kontrollgruppe	43
19. Röntgendokumentation ESWT-Gruppe	44
20. Szintigraphische Auswertung Mischphase	46
21. Beispielszintigramm Knochenstoffwechsel bei Auswertung	48
22. Szintigraphische Auswertung Knochenstoffwechsel post-ESWT	49
23. Szintigraphische Auswertung Knochenstoffwechsel prä-ESWT	50
24. Osteocalcin – Verlaufsdiagramm	51
25. bFGF – Verlaufsdiagramm	52

26.	TGF- β 1 – Verlaufsdiagramm	53
27.	VEGF – Verlaufsdiagramm	54

Tabelle:	Seite:
1. Akustische Impedanz verschiedener Gewebe/Materialien	18
2. Zeitschema aller Behandlungen/Untersuchungen	25
3. Tierexperimentelle Studien ESWT – Übersicht	85
4. Klinische Studien ESWT – Übersicht	87
5. Gesamtübersicht der Daten	88

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Markus Maier für die Überlassung des Themas und die mir jederzeit gewährte Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit. Prof. Dr. med. Markus Maier hat mich durchweg sehr gut betreut und durch seine konstruktive Kritik meinen wissenschaftlichen Werdegang nachhaltig geprägt.

Herrn Dr. med. Jörg Hausdorf, Oberarzt der Orthopädischen Klinik der LMU München, danke ich für die engagierte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und für die sehr gute Betreuung.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Ulrich Pohl, Kommissarischer Direktor des Institutes für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit zur Durchführung der Untersuchungen. Durch die Arbeit an dem Institut für Chirurgische Forschung wurde mein Interesse am experimentellen Arbeiten geweckt. Herrn Professor Dr. med. Michael Delius danke ich für die Hilfe bei der Versuchsplanung. Weiter bedanken möchte ich mich bei Frau Gudrun Höbel für die praktische Unterstützung und Hilfe bei der Auswertung der molekularbiologischen Auswertung der Serumproben.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Christina Baron, Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Stoßwellenforschung, am Institut für Chirurgische Forschung, die mich in vielen praktischen Arbeiten unterstützt hat.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr. med. Peter Bartenstein, Direktor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, sowie Herrn Dr. med. Rainer Linke und Dr. rer. nat. Wolfgang Münzing für die Anleitung zur Durchführung der nuklearmedizinischen Untersuchungen und die jederzeit gewährte Unterstützung und Hilfe bei der Auswertung der szintigraphischen Ergebnisse. Weiter bedanke ich mich für die praktische Unterstützung bei den szintigraphischen Messungen bei Frau Luitgard Schlüsselhuber, MTRA der

nuklearmedizinischen Klinik.

Dank gilt auch der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO Stiftung), Davos, Schweiz, für die großzügige finanzielle Förderung, die erst das unabhängige Arbeiten möglich machte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen, die mich bei der Durchführung und Ausarbeitung der Studie unterstützt haben und hier nicht genannt wurden.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mich während meines gesamten Medizinstudiums und bei der Erstellung der Doktorarbeit jederzeit und uneingeschränkt unterstützt haben.

